

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Camila Alves de Lima

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DO HORMÔNIO
PROGESTERONA EM FÁRMACOS UTILIZANDO ELETRODO
DE FILME DE BISMUTO**

**Florianópolis
2012**

Camila Alves de Lima

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DO HORMÔNIO
PROGESTERONA EM FÁRMACOS UTILIZANDO ELETRODO
DE FILME DE BISMUTO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina como um dos requisitos
para obtenção do Título de Mestre
em Química: Área de concentração:
Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr. Almir Spinelli

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L732d Lima, Camila Alves de

Determinação eletroanalítica do hormônio progesterona em fármacos utilizando o eletrodo de filme de bismuto [dissertação] / Camila Alves de Lima ; orientador, Almir Spinelli. - Florianópolis, SC, 2012.
97 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Eletrodos - Bismuto. 3. Progesterona. 4. Análise eletroquímica. 5. Farmacologia. I. Spinelli, Almir. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

Camila Alves de Lima

**DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DO HORMÔNIO
PROGESTERONA EM FÁRMACOS UTILIZANDO ELETRODO
DE FILME DE BISMUTO**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do Título de
Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2012

Prof. Dr. Almir Spinelli

Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Almir Spinelli
Orientador

Prof^ª. Dr^a. Iolanda C. Vieira
(UFSC)

Prof^ª. Dr^a. Cristiane Jost
(UFSC)

Prof. Dr. Daniel L. G. Borges
(UFSC)

Este trabalho foi desenvolvido no Grupo de Estudos de Processos Eletroquímicos e Eletroanalíticos (GEPEEA), laboratório 310 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Almir Spinelli.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Nelmi e Paulo, meus irmãos, Paulinho e Taísa, e a todos meus familiares, pelo incentivo e força que, mesmo de longe, nunca faltaram.

As minhas grandes amigas Marilze, Manu, Dai e Greice, pelo companheirismo, apoio, ajuda e momentos felizes, principalmente ao longo desses dois anos.

A todos meus amigos de Guarapuava e aos meus novos amigos de Florianópolis.

Ao Professor Almir Spinelli, pela orientação e ensinamentos que contribuíram para meu desenvolvimento científico.

Aos amigos e colegas de trabalho do GEPEEA, Keliana, Otoniel, Fernando, Gabriel, Éder, Paulo, Ana, Thaís, Iolana, que pela amizade fizeram do laboratório um ótimo ambiente de trabalho.

Ao Caio, pela ajuda nos experimentos de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

A todos meus professores da Universidade Estadual do Centro-Oeste e da Universidade Federal de Santa Catarina, pelos ensinamentos repassados ao longo de todos esses anos, contribuindo, assim, para minha formação acadêmica.

À CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de Mestrado concedida.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas,
mas, ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”
(Carl Jung)

RESUMO

Esse trabalho descreve o desenvolvimento de um método eletroanalítico para determinação do hormônio progesterona empregando o eletrodo de filme de bismuto (EFBi). Inicialmente, o EFBi foi preparado pelo método *ex situ*, com a aplicação de um potencial de -300 mV por 12 s em um substrato de carbono vítreo imerso em uma solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ contendo Bi(III) 2,0 x 10⁻² mol L⁻¹. Esses parâmetros foram ajustados de acordo com a resposta para a progesterona 40 µmol L⁻¹ utilizando a técnica de voltametria cíclica. A característica adsortiva da progesterona na superfície do EFBi foi evidenciada, necessitando a aplicação de um potencial de pré-concentração ($E_{pc} = -1,0$ V) e tempo de pré-concentração ($t_{pc} = 60$ s) antes de cada experimento. A redução eletroquímica da progesterona 40 µmol L⁻¹ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0) foi investigada e constatou-se uma transferência eletrônica irreversível de 1 elétron com presença de reação química acoplada. O mecanismo eletroquímico desse hormônio provavelmente está associado à redução da carbonila no agrupamento α , β - insaturado, levando à formação de um dímero. Para o desenvolvimento da metodologia, a voltametria de onda quadrada foi a técnica escolhida. Os parâmetros otimizados foram: frequência 70 Hz, amplitude 50 mV e incremento de potencial 2 mV. Nessas condições, foi obtido um pico de densidade de corrente em -1,63 V referente à redução da progesterona, a qual respondeu de forma linear na faixa de 0,40 a 7,90 µmol L⁻¹, apresentando um limite de detecção de 0,18 µmol L⁻¹. O método foi aplicado na determinação de progesterona em quatro amostras de fármacos. Para a validação do método eletroanalítico desenvolvido, esse foi comparado com o método de quantificação do hormônio por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta. Os resultados obtidos por meio de cálculos estatísticos mostraram que o método proposto utilizando EFBi foi preciso e exato.

Palavras-chaves: Eletrodo de filme de bismuto, Progesterona, Eletroanalítica, Fármacos.

ABSTRACT

This manuscript describes an electroanalytical method for determination of progesterone using the bismuth film electrode (BiFE). The BiFE was initially prepared by the *ex situ* method, by applying a potential of -300 mV for 12 s in a glassy carbon substrate immersed in a solution of HCl 1.0 mol L⁻¹ containing Bi (III) 2.0 x 10⁻² mol L⁻¹. These parameters were adjusted according to the progesterone 40 µmol L⁻¹ response using the technique of cyclic voltammetry. The adsorption characteristics of progesterone on the surface of BiFE were observed, necessitating the application of a pre-concentration potential of E_{pc} = -1.0 V during a pre-concentration time of t_{pc} = 60 s before each experiment. The electrochemical reduction of progesterone 40 µmol L⁻¹ in B-R buffer 0.1 mol L⁻¹ (pH 12.0) was investigated. It was found an irreversible transfer of 1 electron with the presence of coupled chemical reaction. The electrochemical mechanism of this hormone is probably associated to a reduction of the carbonyl group in α, β-unsaturated, leading to the formation of a dimer. To develop the methodology, square wave voltammetry was the chosen technique. The optimized parameters were: frequency of 70 Hz, amplitude of 50 mV and potential increment of 2 mV. Under these conditions, a peak current density at -1.63 V relating to the reduction of progesterone was obtained, which responded linearly in the range 0.40 to 7.90 µmol L⁻¹, with a detection limit of 0.18 µmol L⁻¹. The method was applied to the determination of progesterone on four samples of pharmaceuticals. To validate the developed electroanalytical method, this method was compared to the quantification of the hormone by absorption spectrometry in the ultraviolet region. The results obtained by statistical calculations showed that the proposed method using BiFE was precise and accurate.

Keywords: Bismuth film electrode, Progesterone, Electroanalysis, Pharmaceuticals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da progesterona.....	35
Figura 2. Esquema de produção de esteróides naturais a partir do colesterol.....	36
Figura 3. Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo para voltametria cíclica.....	42
Figura 4. Voltamograma cíclico para um sistema reversível no qual Ox representa a espécie oxidada e Red a espécie reduzida.....	42
Figura 5. Forma de aplicação de pulsos em voltametria de onda quadrada.....	45
Figura 6. Voltamogramas de onda quadrada para um processo redox de (1) um sistema reversível (2) sistema irreversível. Fonte: Souza, Machado e Avaca, 2003.....	46
Figura 7. Esquema do procedimento de pré-concentração por adsorção e redissolução catódica usada na determinação de íons metálicos complexados.....	49
Figura 8. Voltamograma cíclico para Bi(III) $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ sobre GCE, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$	56
Figura 9. Influência dos parâmetros de preparação <i>ex situ</i> do EFBi: (A) potencial de deposição, $t_d = 8 \text{ s}$, (B) tempo de deposição, $E_d = -0,3 \text{ V}$ na densidade de corrente da progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) por voltametria cíclica $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$	57
Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada para (a) GCE e (c) EFBi em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) e (b e c) na presença de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, $f = 50 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$	58
Figura 11. Voltamogramas cíclicos completo para: (a) branco, (b) progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$, sobre EFBi.....	59
Figura 12. Voltamogramas cíclicos para dez ciclos sucessivos para a progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), sendo a) o primeiro ciclo e b) o décimo ciclo sobre EFBi, $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$	560
Figura 13. Influência dos parâmetros de pré-concentração: (A) potencial de pré-concentração, $t_{pc} = 60 \text{ s}$, (B) tempo de pré-concentração, $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, na densidade de corrente da progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) por voltametria cíclica ($\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$), utilizando o EFBi.....	61
Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada para progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$. (a) sem pré-concentração e (b) com pré-concentração $E_{pc} = -$	

1,0 V, $t_{pc} = 60$ s em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0), $f = 50$ Hz, $a = 60$ mV e $\Delta E_s = 4$ V utilizando o EFBi.....62

Figura 15. Estudo do pH : (A) voltamogramas cíclicos, (B) potencial e C) densidade de corrente em função do pH para o EFBi na presença de progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0) por voltametria cíclica, $\nu = 200$ mV s⁻¹. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....65

Figura 16. Voltamogramas cíclicos para progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em EFBi imerso em soluções 0,1 mol L⁻¹ de (a) B-R (pH 12,0), (b) NaOH (pH 12,0), (c) Ringer (pH 12,0), (d) LiOH (pH 12,0), $\nu = 200$ mV s⁻¹. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....66

Figura 17. Voltamogramas cíclico para progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em EFBi imerso em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0), ν (a) 50 mV s⁻¹, (b) 100 mV s⁻¹, (c) 150 mV s⁻¹, (d) 200 mV s⁻¹, (e) 250 mV s⁻¹ e (f) 300 mV s⁻¹. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....67

Figura 18. Variação do E_{pr} da progesterona com a ν para uma solução de progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....68

Figura 19. Variação da j_{pc} com a raiz quadrada da ν para uma solução de progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....68

Figura 20. Variação da função corrente do pico de redução da progesterona com a ν para uma solução de progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....69

Figura 21. Variação do $\log - j_{pc}$ com o $\log \nu$ para uma solução de progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....70

Figura 22. Variação do E_{pr} com o $\log \nu$ para uma solução de progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.....71

Figura 23. Voltamogramas de (a) pulso diferencial, (b) pulso normal e (c) onda quadrada para a progesterona 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em EFBi em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s...73

Figura 24. Dependência da corrente catódica com (A) frequência ($a = 25$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV), (B) amplitude de pulso ($f = 70$ Hz e $\Delta E_s = 2$ mV) e (C) incremento de potencial ($f = 70$ Hz e $a = 50$ mV) para um EFBi imerso em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0) contendo progesterona 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Dados obtidos por voltametria de onda quadrada.....75

- Figura 25.** A) Voltamogramas de onda quadrada para a progesterona em solução de tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) em EFBi: (a) branco, (b) $0,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $0,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $1,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $4,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $5,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (j) $6,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (k) $7,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Dependência da j_{pc} em função da concentração da progesterona (curva de calibração). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$77
- Figura 26.** A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), (b) adição de $75 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra de creme de progesterona; (c-e) adição de $25 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona; (f) adição de $50 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Curva de adição de padrão para amostra de gel de progesterona e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$81
- Figura 27.** A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), (b) adição de $100 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra de creme de progesterona; (c) adição de $75 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona; (d-g) adição de $25 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Curva de adição de padrão para amostra de creme de progesterona e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$81
- Figura 28.** A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), (b) adição de $125 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra de solução capilar de progesterona; (c) adição de $50 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona; (d-g) adição de $25 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Curva de adição de padrão para amostra de solução capilar de progesterona e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$82
- Figura 29.** A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), (b) adição de $100 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra de Utrogestan®; (c-f) adição de $25 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Curva de adição de padrão para amostra de Utrogestan® e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$82
- Figura 30.** Espectro de absorção no ultravioleta para: a) etanol e (b) uma solução de progesterona $47,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol.....87
- Figura 31.** Espectros de absorção no ultravioleta (a) branco, (b) $12,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $18,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $24,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $30,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $36,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $41,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $47,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $52,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (j) $57,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e curva de calibração da absorbância (240 nm) em

função da concentração da progesterona para os dados já mencionados.....	87
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição sobre a progesterona.....	35
Tabela 2- Características sobre a reversibilidade do sistema por meio de dados obtidos por voltametria de onda quadrada.....	47
Tabela 3- Otimização dos parâmetros experimentais por SWV para análise de progesterona.....	76
Tabela 5- Estudo dos possíveis interferentes para a determinação da progesterona em fármacos.....	80
Tabela 6- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra A pelo método proposto.....	83
Tabela 7- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra B pelo método proposto.....	83
Tabela 8- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra C pelo método proposto.....	84
Tabela 9- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra D pelo método proposto.....	84
Tabela 10- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra A.....	85
Tabela 11- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra B.....	85
Tabela 12- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra C.....	86
Tabela 13- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra D.....	86
Tabela 14- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona em amostras diversas usando o método comparativo.....	88
Tabela 15- Tratamento estatístico da determinação de progesterona em medicamentos.....	90

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ΔE_s – Incremento de potencial

a – Amplitude de pulso

AC (do inglês *alternating current*) - Corrente alternada

CLEIA – (do inglês *chemiluminescence enzyme immunoassay*)-

Imunoensaio quimioluminescente enzimático

CV – (do inglês *cyclic voltammetry*)- Voltametria cíclica

DC (do inglês *direct current*)- Corrente direta

DP – Desvio padrão

DPR- Desvio padrão relativo

DS – (do inglês *derivative spectrophotometry*)- Espectrofotometria derivada.

E - Potencial

E_d – Potencial de deposição

EFBi – Eletrodo de filme de bismuto

E_p - Potencial de pico

E_{pc} – Potencial de pré-concentração

E_{po} – Potencial de pico de oxidação

E_{pr} – Potencial de pico de redução

E_{r1} - Erro relativo entre o método proposto ou comparativo e os valores rotulados

E_{r2} - Erro relativo entre o método proposto e o método comparativo

f – Frequência

GCE – (do inglês *glassy carbon electrode*)- Eletrodo de carbono vítreo

GLC – (do inglês *gas - liquid chromatography*)- Cromatografia líquida-gasosa

HPLC – (do inglês *high performance liquid chromatography*)-
Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC – UV – (do inglês *high performance liquid chromatography and ultraviolet detection*)- Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta

i – Corrente

i_p – Corrente de pico

j – Densidade de corrente para voltametria cíclica

$j_p v^{-1/2}$ – Função corrente

j_{pa} – Densidade de corrente anódica

j_{pc} – Densidade de corrente catódica

LC-MS/MS – (do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*)-
Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

SWV – (do inglês *square wave voltammetry*)- Voltametria de onda quadrada

t_d – Tempo de deposição

TIRF- (do inglês *total internal reflectance fluorescence*)- Fluorescência por reflectância interna

t_{pc} – Tempo de pré-concentração

TR-FIA – (do inglês *Direct time – resolved fluoroimmunoassay*)- Ensaio imunofluorimétrico de tempo resolvido

UV- Ultravioleta

Δj – Densidade de corrente para voltametria de onda quadrada

Δj_{pc} - Densidade de corrente catódica para voltametria de onda quadrada

v – Velocidade de varredura de potencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Eletrodos de filme de bismuto	27
2.1.1 <i>Preparação do EFBi</i>	28
2.1.2 <i>Emprego do EFBi para detecção de metais</i>	28
2.1.3 <i>Emprego do EFBi para detecção de compostos orgânicos</i>	31
2.2 Hormônio progesterona	34
2.2.1 <i>Progesterona</i>	34
2.2.2 <i>Determinação de progesterona por métodos cromatográficos e imunoensaios</i>	37
2.2.3 <i>Estudos eletroquímicos e determinações eletroanalíticas de progesterona</i>	38
2.3 Técnicas eletroanalíticas	41
2.3.1 <i>Voltametria cíclica</i>	41
2.3.2 <i>Voltametria de onda quadrada</i>	44
2.3.3 <i>Voltametria de redissolução</i>	47
3 OBJETIVOS	50
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos	50
3.2.1 <i>Deposição ex situ do filme de bismuto em substrato de carbono vítreo e estudo do comportamento eletroquímico da progesterona por voltametria cíclica</i>	50
3.2.2 <i>Desenvolvimento e aplicação da metodologia</i>	50
4 PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1 Reagentes, soluções e amostras	51
4.1.1 <i>Reagentes</i>	51
4.1.2 <i>Soluções</i>	51
4.1.3 <i>Amostras</i>	51
4.2 Equipamentos	52

4.2.1 Experimentos voltamétricos.....	52
4.2.2 Experimentos espectrofotométricos de absorção no ultravioleta.....	52
4.3 Procedimento experimental.....	52
4.3.1 Experimentos voltamétricos.....	52
4.3.2 Experimentos espectrofotométricos.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Preparo do EFBi e estudo do comportamento eletroquímico da progesterona utilizando voltametria cíclica.....	55
5.1.1 Preparo do EFBi por eletrodeposição <i>ex situ</i> e sua resposta diante da progesterona.....	55
5.1.2 Comportamento eletroquímico da progesterona por voltametria cíclica.....	58
5.2 Desenvolvimento e aplicação da metodologia.....	72
5.2.1 Desenvolvimento do método eletroanalítico.....	72
5.2.2 Aplicação da metodologia para a determinação de progesterona em fármacos.....	80
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	91
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A natureza tóxica do mercúrio foi um fator que limitou a utilização de eletrodos desse metal, como, por exemplo, o eletrodo gotejante de mercúrio e o eletrodo de filme de mercúrio, os quais chegaram a ser evitados em diversos países. Entretanto, esses eletrodos durante décadas apresentaram como vantagem desempenho significativo principalmente na detecção de metais.^{(1), (2), (3)} Assim, o desafio de encontrar um novo eletrodo para substituir com eficiência os eletrodos de mercúrio foi lançado para os pesquisadores. Surgiram, então, os eletrodos de bismuto, um passo à frente para a ciência.

Com o intuito de substituir os eletrodos de mercúrio, em 2000, pesquisadores de Las Cruces começaram a testar eletrodos utilizando bismuto.⁽⁴⁾ Pelo fato do bismuto não possuir toxicidade considerável, o eletrodo deste material é considerado ambientalmente correto. Além dessa qualidade, os eletrodos de bismuto são viáveis economicamente, apresentam insensibilidade ao oxigênio, podem ser depositados em diversos tipos de substratos, possuem alta estabilidade mecânica, e, ainda, as propriedades físico-químicas do bismuto são semelhantes às propriedades do mercúrio.^{(3), (4), (5)}

O trabalho pioneiro que demonstrou a utilização de eletrodos de bismuto foi desenvolvido por Wang *et al.*⁽⁴⁾ em 2000. Os autores empregaram o eletrodo de filme de bismuto (EFBi) para identificação dos metais Pb(II), Cd(II) e Zn(II) por voltametria de redissolução anódica. Já o potencial do EFBi para determinação de compostos orgânicos foi inicialmente testado por Ogorevc *et al.*⁽³⁾ em 2001, no qual o EFBi foi aplicado para determinação de 2-nitrofenol. Esses foram os primeiros trabalhos desenvolvidos para o estudo de metais e compostos orgânicos utilizando esse eletrodo. Os resultados apresentaram-se satisfatórios e muito parecidos com os resultados obtidos para as mesmas substâncias em eletrodo de filme de mercúrio.

Nos anos seguintes, essa área apresentou notável crescimento, com inúmeros trabalhos sobre eletrodos, detectores, sensores de vários tipos e configurações baseados em bismuto. Em 11 anos de sua existência, há centenas de trabalhos encontrados na literatura sobre a determinação e comportamento eletroquímico de inúmeros metais, compostos orgânicos de interesse ambiental, farmacêutico e biológico, demonstrando assim seu amplo potencial no campo das eletroanálises.

Apesar disso, ainda há pouco sobre determinação de compostos de relevância biológica e até o momento nenhuma publicação sobre determinação de hormônios. Por esse motivo, esse trabalho tem como

intuito o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica empregando o EFBi para quantificação de progesterona.

A progesterona (pregn-4-eno-3,20-diona) pertence a um grupo de hormônios esteróides originados do colesterol e apresenta um papel importante na estabilização e manutenção do período de gestação em mamíferos, atuando também na rota sintética de vários esteróides biologicamente ativos. O desequilíbrio desse hormônio no organismo pode causar problemas de infertilidade e má formação do sistema reprodutivo. Na indústria farmacêutica, esse hormônio é utilizado como princípio ativo em vários fármacos, visando o tratamento de muitos problemas, como, por exemplo, prevenção do aborto. A farmacopeia brasileira sugere que a quantificação desse hormônio em fármacos seja feita por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.⁽⁶⁾

Neste contexto, este trabalho visa o desenvolvimento de uma metodologia alternativa, de baixo custo, rápida, precisa, exata e seletiva para determinação de progesterona em formulações farmacêuticas, empregando o EFBi. Vale ressaltar que se encontrou, na literatura, um número muito pequeno de trabalhos onde esse eletrodo foi empregado para a determinação de compostos orgânicos biologicamente ativos, estimulando ainda mais esta pesquisa.

Para fins de apresentação, esta dissertação foi dividida em sete capítulos: além deste capítulo introdutório, apresenta-se no capítulo 2 uma revisão bibliográfica dividida em três partes sobre os seguintes temas: 1) o eletrodo de filme de bismuto, sua preparação e aplicações; 2) progesterona e seus métodos de análises; 3) as técnicas eletroanalíticas envolvidas nesse trabalho. No capítulo 3 estão apresentados os objetivos, e a descrição referente à parte experimental está relatada no capítulo 4. No capítulo 5 são apresentados os resultados obtidos e a discussão acerca de tais resultados, e no capítulo 6 encontram-se as considerações finais do trabalho. Finalmente, no capítulo 7 são exibidas as referências bibliográficas utilizadas como fonte de pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

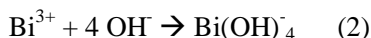
2.1 Eletrodos de filme de bismuto

Entre os eletrodos de bismuto, os eletrodos à base de um filme são os mais empregados para análises de metais e compostos orgânicos. A formação desse eletrodo consiste, basicamente, na eletrodeposição de um filme fino de Bi metálico sobre a superfície de um substrato. O bom funcionamento do EFBi depende da estrutura do filme. Uma homogeneidade do filme formado é de fundamental importância para o desenvolvimento do método eletroanalítico. Por esse motivo, o preparo do eletrodo deve ser feito com condições experimentais ajustadas, ou seja, os parâmetros de deposição devem ser cuidadosamente otimizados, pois esses irão definir a morfologia do filme. Os parâmetros de deposição como o tempo de deposição (t_d) e potencial de deposição (E_d) são dependentes do substrato e também do analito a ser determinado.

A eletrodeposição dos íons Bi(III) em um substrato ocorre essencialmente em meio ácido. A preparação em meio neutro ou levemente alcalino torna os íons Bi(III) bastante susceptíveis à hidrólise, formando complexos insolúveis, como demonstrado na Equação 1. ⁽¹⁾



Entretanto, estudiosos já constataram que há possibilidade de eletrodeposição de íons Bi(III) em meio altamente alcalino, pois nessas condições os íons Bi(III) não hidrolisam, formando complexos estáveis com íons OH^- , como mostra a Equação 2. ⁽¹⁾



Na literatura, são encontrados diversos tipos de substratos para os EFBi como filme de carbono eletrogerado ⁽⁷⁾, diamante dopado com boro ⁽⁸⁾, fibra de carbono ⁽⁹⁾, eletrodos impressos ⁽¹⁰⁾, metais (Cu, Au) ⁽¹¹⁾, ⁽¹²⁾, pasta de carbono ⁽¹³⁾, ⁽¹⁴⁾. Entre eles, o maior número de trabalhos reportados relata o eletrodo de carbono vítreo como substrato, pois esse apresenta uma pequena corrente de fundo e baixa porosidade.

O revestimento da superfície do substrato com filme de bismuto pode ser feito basicamente por dois métodos bastante utilizados: *in situ* e *ex situ*.

2.1.1 Preparação do EFBi

2.1.1.1 Eletrodeposição *in situ* do EFBi

A deposição *in situ* do filme de bismuto acontece na mesma solução onde está o analito que será determinado. O filme é formado quando se aplica um determinado potencial capaz de reduzir tanto os íons Bi (III) em solução quanto o analito na superfície do substrato, logo, o filme será composto do analito de interesse juntamente com Bi⁰. Após esta etapa, uma varredura de potencial no sentido contrário da deposição (sentido positivo) deve ser aplicada para que o analito se oxide, possibilitando a sua quantificação. Quando se aplica a varredura no sentido positivo, em um determinado momento atinge-se um potencial necessário para oxidação do Bi metálico, acarretando a redissolução do filme. Dessa forma, o filme é retirado da superfície do substrato, que, por sua vez, fica pronto para a realização de uma próxima medida.

Utiliza-se bastante essa forma de deposição para determinações de íons metálicos que possuam comportamento reversível, pois é essencial que haja a redução e oxidação do analito. A deposição *in situ* simplifica e torna mais rápida a análise experimental, porém apresenta suas limitações como o preparo essencialmente em meio ácido.

Nesse trabalho, pelo fato do filme ser preparado em meio ácido e o hormônio progesterona responder em meio alcalino, utilizou-se o método *ex situ*.

2.1.1.2 Eletrodeposição *ex situ* do EFBi

Na deposição *ex situ*, a formação do filme e a determinação do analito ocorrem em soluções diferentes. Em uma solução de sal de bismuto geralmente em meio ácido, aplica-se um potencial por um determinado tempo e obtém-se um filme de bismuto metálico na superfície do substrato. Após a formação do filme, o EFBi é transferido para outra solução onde os experimentos com o analito serão realizados.

2.1.2 Emprego do EFBi para detecção de metais

Em virtude da abrangência de pesquisas demonstrando a aplicabilidade do EFBi na detecção de metais, a seguir serão relatados alguns dos trabalhos encontrados na literatura nos últimos 2 anos.

Hu *et al.*⁽¹⁵⁾ determinaram Cd(II) por voltametria de redissolução anódica no qual o eletrodo utilizado foi o filme de bismuto revestido com nafion em substrato de carbono vítreo. A eletrodeposição ocorreu de forma *in situ*, no qual um potencial de -1,3 V por 100 s foi aplicado em uma solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ contendo Bi(III) 1,0 mg L⁻¹. O método proposto respondeu linearmente na faixa de 2 a 100 µg L⁻¹. O limite de detecção encontrado foi de 0,88 µg L⁻¹ e a repetibilidade, expressa pelo desvio padrão relativo (DPR), foi igual a 3,65% para um número de repetições igual a 11. O método foi aplicado para determinação de Cd(II) em amostras de água ambientais e os resultados de recuperação variaram de 97,1 – 103,4%.

Outro trabalho para quantificação de Cd(II) foi desenvolvido por Wang *et al.*⁽¹⁶⁾, porém dessa vez foi uma determinação simultânea de Cd(II) e Pb(II) em amostras reais, como água de rio e sangue humano. Os autores utilizaram a técnica de redissolução anódica no modo pulso diferencial empregando o eletrodo de filme de bismuto em substrato de carbono vítreo modificado com um filme de nanofibras de grafite/nafion. O filme foi obtido, de forma *in situ*, com a aplicação de um potencial de deposição de -1,2 V por 120 s no substrato imerso em uma solução de Bi(III) 400 mg L⁻¹ em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,5). Os limites de detecção encontrados foram de 0,09 µg L⁻¹ e 0,02 µg L⁻¹ para o Cd(II) e Pb(II), respectivamente. A repetibilidade encontrada para 16 medidas na concentração 20 µg L⁻¹ foi 1,4% para o Cd(II) e 2,1% para o Pb(II). Os resultados foram satisfatórios, demonstrando uma ótima sensibilidade e reprodutibilidade do EFBi modificado.

Outra recente publicação foi de Li *et al.*⁽¹⁷⁾ na qual um eletrodo de filme de bismuto foi aplicado para determinação de Se(IV) por redissolução adsorptiva no modo pulso diferencial. O filme foi eletrodepositado na superfície do carbono vítreo por aplicação de -1,0 V por 5 minutos em uma solução de Bi(III) 100 mg L⁻¹ em solução de tampão acetato 1,0 mol L⁻¹. Em seguida, o eletrodo foi transportado para uma célula contendo o tampão, Se(IV) e agentes complexantes, onde ocorria a pré-concentração do analito e os experimentos posteriores. A faixa linear variou de 2 - 30 µg L⁻¹ e o limite de detecção foi 0,1 µg L⁻¹. O desvio padrão relativo encontrado para 8 medidas de uma solução de Se(IV) 10 µg L⁻¹ foi de 4,91%. O método desenvolvido foi aplicado para determinação de Sn(IV) em tabletes vitamínicos e cabelo humano. Os estudos de recuperação para as determinações em amostras ficaram entre 96,1% e 100,3%, provando a exatidão do método proposto.

Arduini *et al.*⁽¹⁸⁾ fizeram um estudo comparativo do eletrodo de filme de bismuto para determinação de Pb(II). Eles obtiveram o filme de

modo *in situ*, *ex situ* e também em pasta de grafite, sendo o eletrodo impresso de grafite utilizado como substrato. Para o preparo do filme de bismuto na forma *ex situ* e *in situ*, foi utilizada uma solução de Bi(III) $500 \mu\text{g L}^{-1}$ e o potencial e o tempo de deposição foram de -1,1 V e 300 s, respectivamente. Os resultados analíticos demonstraram melhores respostas para o eletrodo obtido na forma *in situ*, sendo esse o eletrodo utilizado para a determinação de Pb(II) em diversas amostras de água de rio.

Hu *et al.* ⁽¹⁹⁾ determinaram Pb(II) e Cd(II) simultaneamente em águas residuais com a técnica de redissolução no modo onda quadrada. Os autores depositaram o filme de bismuto em um substrato descartável, baseado em eletrodo de grafite. A deposição do filme foi feita de maneira *in situ*, em que se aplicou um potencial de -1,2 V por 300 s. A oxidação dos dois metais apresentou picos bem definidos em -0,62 V para o Pb(II) e -0,85 V para o Cd(II), sendo os limites de detecção obtidos de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,47 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Pb(II) e Cd(II), respectivamente. Os resultados foram bastante satisfatórios, apresentando uma ótima seletividade.

Sensores descartáveis micrométricos de filme de bismuto foram desenvolvidos por Economou *et al.* ⁽²⁰⁾ para análises de metais traços por voltametria de redissolução anódica. O EFBi foi obtido pela técnica de “sputtered”, sendo utilizado para determinação de Pb(II) e Cd(II) em amostras certificadas de água de lago. O limite de detecção obtido foi $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ tanto para o Cd(II) quanto para o Pb(II) e os desvios padrão relativos para os dois analitos foram menores que 4%.

Aggarwal *et al.* ⁽²¹⁾ demonstraram a possibilidade de determinação de Ga(III) em água industrial subterrânea. Os autores prepararam o EFBi utilizando o método *in situ*. O potencial de deposição aplicado foi de -1,2 V por 240 s em um eletrodo de carbono vítreo na presença de Bi(III) $500 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando-se como eletrólito suporte o tampão acetato (pH 4,5). A técnica utilizada foi voltametria de redissolução anódica seguida de onda quadrada. A faixa linear obtida foi de $20\text{-}100 \mu\text{g L}^{-1}$ e o limite de detecção foi $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados obtidos pelo EFBi foram melhores quando comparados com resultados obtidos por eletrodo de filme de mercúrio. Os resultados totais demonstraram que o método desenvolvido pode ser aplicado na determinação de Ga(III) em águas industriais subterrâneas.

O EFBi preparado na forma *ex situ* foi utilizado por Segura *et al.* ⁽²²⁾ para determinação de Ni(II) complexado com 1-nitro-2-naftol por voltametria de redissolução adsorptiva. A eletrodeposição de íons Bi(III) 100mg L^{-1} em superfície de carbono vítreo ocorreu com a aplicação de

um potencial de -1,0 V por 120 s em tampão acetato (pH 5,0). O limite de detecção obtido foi $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e a faixa linear variou de 10 a $70 \mu\text{g L}^{-1}$. A precisão expressa pelo desvio padrão relativo foi de 3,5%. O método proposto foi validado com a determinação do Ni(II) em amostras de água de um lago e os resultados obtidos foram bastante aceitáveis.

Outro trabalho recente que demonstra aplicabilidade dos EFBi na determinação de íons metálicos foi desenvolvido por Spinelli *et al.*⁽²³⁾. Os autores empregaram o EFBi para determinação eletroanalítica de Sn(IV) por voltametria de redissolução anódica no modo onda quadrada. Para a eletrodeposição do filme, um potencial de -1,2 V por 90 s foi aplicado sobre a superfície do carbono vítreo em uma solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5) contendo íons Bi(III) $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O método desenvolvido foi empregado na determinação de Sn(IV) em amostras de biodiesel e os resultados obtidos da quantificação foram comparados com o método de espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. A faixa linear encontrada foi de $0,17\text{-}7,83 \mu\text{mol L}^{-1}$ e os limites de detecção e quantificação foram iguais a $0,14 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,47 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados utilizando EFBi revelaram precisão e exatidão do método desenvolvido.

2.1.3 Emprego do EFBi para detecção de compostos orgânicos

Desde o surgimento do EFBi, muitos trabalhos já foram desenvolvidos demonstrando a sua eficiência na quantificação de íons metálicos, enfatizando, dessa maneira, o seu potencial como substituinte dos eletrodos de filme de mercúrio. No entanto, se comparadas com a quantidade de trabalhos na detecção metais, poucas são as publicações encontradas sobre a aplicação do EFBi na determinação de compostos orgânicos. Estas se restringem ainda mais quando os compostos orgânicos são de importância biológica.

O primeiro trabalho demonstrando a aplicabilidade do eletrodo de bismuto para determinação de compostos orgânicos foi desenvolvido por Ogorevc *et al.*⁽³⁾ em 2001, em que o composto analisado foi o 2-nitrofenol. A eletrodeposição *ex situ* de íons Bi(III) $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ na superfície do eletrodo de carbono vítreo aconteceu com a aplicação de um potencial de -1,0 V durante 60 s em solução de tampão acetato. O comportamento do 2-nitrofenol em EFBi mostrou-se bem semelhante quando comparado ao comportamento desse mesmo composto no eletrodo de filme de mercúrio e no eletrodo de carbono vítreo.

Entusiasmados com os resultados obtidos para detecção do 2-nitrofenol, novamente Ogorevc *et al.*⁽²⁴⁾ estudaram a aplicação do EFBi na determinação catódica de 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol. O filme de bismuto foi obtido *ex situ*, pela aplicação de um potencial de -1,0 V por 60 s no substrato de carbono vítreo submerso em solução de tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ (pH 4,5) contendo Bi(III) 5,0 mg L⁻¹. Os limites de detecção encontrados foram 0,3 µg L⁻¹, 0,6 µg L⁻¹ e 0,7 µg L⁻¹ para o 2-nitrofenol, 4-nitrofenol e 2,4-dinitrofenol, respectivamente.

Outro composto orgânico determinado foi o inseticida Thiamethoxan por Tóth *et al.*⁽²⁵⁾ Os autores empregaram um EFBi obtido de modo *ex situ* na superfície do carbono vítreo. As condições para a formação do filme foram otimizadas, sendo que os melhores valores para potencial e tempo de deposição foram -0,25 V e 60 s, respectivamente. O inseticida foi determinado por voltametria de pulso diferencial em uma solução contendo tampão B-R (pH 8,0). A faixa linear compreendeu valores entre 1,26 - 45 µg cm⁻³ e os valores para o limite de quantificação e detecção foram de 1,26 µg cm⁻³ e 0,38 µg cm⁻³, respectivamente. O método foi aplicado para determinação do inseticida em amostras de milho e batata.

Arribas *et al.*⁽²⁶⁾ empregaram o EFBi para análise direta do herbicida Metamitron por voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial. Para a eletrodeposição de íons Bi(III) 0,5 mmol L⁻¹ em eletrodo de pasta de carbono, foi aplicado um potencial de -0,6 V por 240 s em solução de tampão acetato 0,10 mol L⁻¹. Um pico de redução foi registrado para o herbicida em um potencial de -0,67 V. A faixa linear de concentração abrangeu valores entre 10 a 200 µmol L⁻¹ e o limite de detecção encontrado foi de 2 µmol L⁻¹.

Du *et al.*⁽²⁷⁾ aplicaram o EFBi para análises eletroquímicas do pesticida metil paration. Os parâmetros otimizados para a preparação do EFBi em substrato de carbono vítreo foram -1,0 V por 80 s em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,5) contendo Bi(III) 1,25 mg mL⁻¹ e o surfactante brometo de trimetilcetil amônio. A faixa linear obtida da curva de calibração variou de 3-100 ng mL⁻¹, sendo o limite de detecção igual a 1,2 ng mL⁻¹.

Moreno *et al.*⁽²⁸⁾ comprovaram a aplicabilidade do EFBi na determinação dos herbicidas metamitron, metribuzin, hidrazina maleica e atrazina. O EFBi foi preparado aplicando-se um potencial -0,53 V por 360 s em solução de H₂SO₄ 0,10 mol L⁻¹ contendo Bi (III) 125 mg L⁻¹. Metribuzin foi determinado por voltametria de onda quadrada e o método apresentou um limite de detecção de 6 µmol L⁻¹. O método

desenvolvido para determinação dos herbicidas com o EFBi apresentou melhores resultados quando confrontado aos resultados da determinação dos mesmos herbicidas com eletrodo de carbono vítreo.

Compostos de relevância farmacêutica também foram analisados e determinados pelo EFBi. Kanatharana *et al.*⁽²⁹⁾ prepararam um filme de bismuto sobre superfície de carbono vítreo e utilizaram um sistema de injeção em fluxo com detecção amperométrica para análise de tetraciclina. Os parâmetros para a formação do EFBi foram otimizados, e um potencial de -0,3 V foi aplicado por 6 minutos no substrato de carbono vítreo em uma solução de tampão acetato 100 mmol L⁻¹ contendo Bi(III) 1,5 mmol L⁻¹. O método desenvolvido foi utilizado para determinação do antibacteriano em cápsulas e os resultados de recuperação entre 86 a 106% demonstraram uma boa exatidão.

Barrato *et al.*⁽³⁰⁾ determinaram diclofenaco de sódio em fármacos empregando o EFBi. Para isso, eles desenvolveram um sistema de injeção em fluxo com detector amperométrico. Os autores obtiveram uma faixa linear de 6,0 a 50,0 µmol L⁻¹ com limite de detecção igual a 4,3 µmol L⁻¹.

Spinelli *et al.*⁽³¹⁾ demonstraram a aplicabilidade do EFBi para determinação do antibiótico sulfadiazina, utilizando a voltametria de pulso diferencial. O filme de bismuto foi obtido aplicando-se um potencial de -0,8 V por 100 s em uma solução de Bi(III) 3,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. O método desenvolvido respondeu de forma linear em duas faixas de concentração: a primeira região linear encontrou-se dentro da faixa de 3,2 - 20,0 µmol L⁻¹ e uma segunda de 20,0 - 96,8 µmol L⁻¹. Limites de detecção de 2,1 µmol L⁻¹ e 12,2 µmol L⁻¹ foram alcançados para a primeira e segunda regiões lineares respectivamente. O EFBi foi aplicado para determinação de sulfadiazina em fármacos e os resultados de recuperação demonstraram exatidão do método proposto.

Hocevar *et al.*⁽³²⁾ utilizaram o EFBi na determinação de citrato de sildenafil, comumente chamado de Viagra®, empregando a voltametria de redissolução adsorptiva. O filme de bismuto foi obtido de modo *ex situ* sobre a superfície de carbono vítreo com a aplicação de -1,0 V por 60 s em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,5) contendo Bi (III) 5 mg L⁻¹. O limite de detecção encontrado para um tempo de pré-concentração de 120 s foi de 1,8 x 10⁻⁸ mol L⁻¹.

Nigović *et al.*⁽³³⁾ empregaram o EFBi preparado *ex situ* sobre um eletrodo de carbono vítreo, na determinação das drogas sulfasalazina e olsalazina. O EFBi foi obtido através da aplicação do potencial de deposição de -1,0 V durante 60 s em solução de Bi(III) 5 mg L⁻¹

contendo tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,5). A metodologia desenvolvida forneceu um limite de detecção de $0,557 \text{ mg L}^{-1}$ para a sulfasalazina e $0,066 \text{ mg L}^{-1}$ para a olsalazina.

Poucos foram os trabalhos encontrados na literatura relatando aplicabilidade de EFBi como biossensores para análise de compostos biológicos. Timur *et al.*⁽³⁴⁾ desenvolveram um método para a detecção da atividade de α -glucosidase empregando um EFBi sobre substrato de carbono vítreo. O EFBi foi preparado pela eletrodeposição de íons Bi(III) $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ na superfície de carbono vítreo pela aplicação de um potencial de $-1,1 \text{ V}$ durante 5 minutos em tampão acetato 100 mmol L^{-1} (pH 4,5). O biossensor respondeu linearmente dentro da faixa $0,033 - 0,330 \text{ mmol L}^{-1}$. Outro trabalho que aplicou o EFBi como biossensor foi mostrado por Anik *et al.*⁽³⁵⁾. O filme de bismuto obtido na forma *ex situ* foi eletrodepositado aplicando-se um potencial de $-1,1 \text{ V}$ por 5 minutos na superfície de carbono vítreo em uma solução de tampão acetato 100 mmol L^{-1} (pH 4,5) na presença de Bi(III) $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Após a formação do filme, a enzima glicose oxidase foi incorporada, obtendo-se assim o biossensor que foi empregado para determinação de glicose. Uma relação linear entre a resposta do sensor e a concentração de glicose foi obtida no intervalo de $0,2 - 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$, e um limite de detecção igual a $40,56 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ foi encontrado.

2.2 Hormônio progesterona

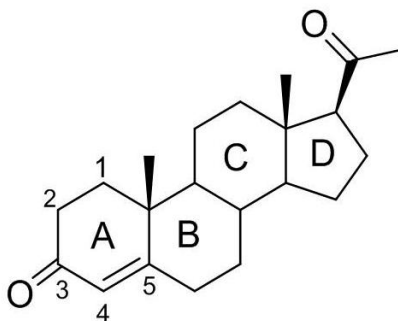
2.2.1 Progesterona

Na Tabela 1 estão relatadas algumas das características do hormônio sexual progesterona (pregn-4-eno-3,20-diona) de massa molecular $314,46 \text{ g mol}^{-1}$ (Figura 1). Esse hormônio pertence à classe dos progestógenos, sendo, dessa classe, o único natural. É produzido pelo corpo lúteo, placenta, adrenais e sistema nervoso. A principal função desse hormônio é preparar o útero da mulher para uma possível gestação e também estimular a produção de leite. Tem importância fundamental nos processos de menstruação, fecundação, transporte e implantação do óvulo fecundado, manutenção da gravidez e lactação. A progesterona é o primeiro hormônio a ser produzido na rota dos hormônios esteróides originados do colesterol, tornando-se um intermediário na síntese dos outros hormônios esteróides (Figura 2).⁽³⁶⁾

Tabela 1- Descrição sobre a progesterona

Hormônio	Solubilidade	Ponto de Fusão	Características físicas
Progesterona (pregn-4-eno-3,20-diona)	1)Insolúvel: água, 2)Solúvel: etanol, acetona e dioxana 3)Pouco solúvel: óleos vegetais.	131 °C	Pó cristalino branco, inodoro e insípido. Estável ao ar.

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010.

**Figura 1.** Estrutura química da progesterona.

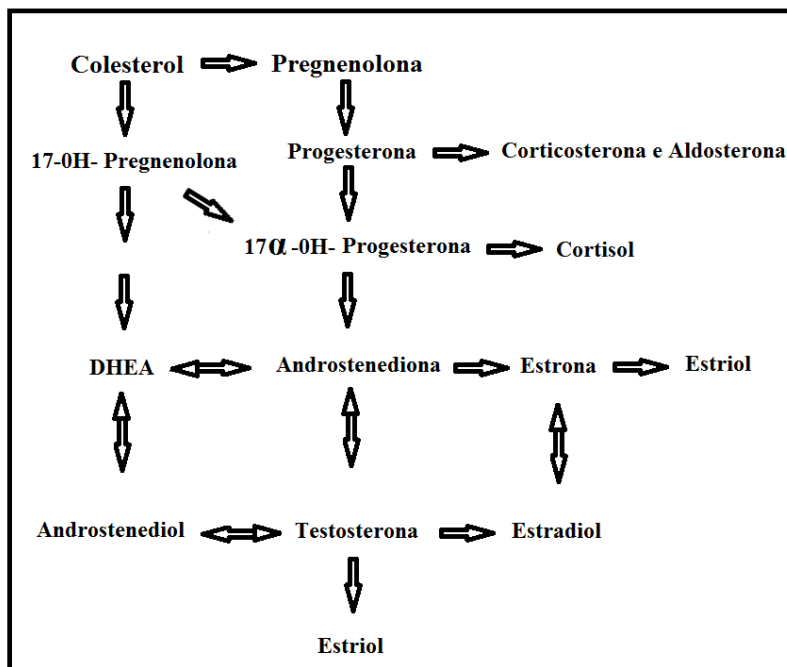


Figura 2. Esquema de produção de esteróides naturais a partir do colesterol.

Na indústria farmacêutica, a progesterona é bastante utilizada para tratamento de reposição hormonal, amenorreia (menopausa), dismenorreia (cólicas menstruais), endometriose (presença do endométrio fora do útero), infertilidade, anticoncepção, alopecia androgênica (queda de cabelo), displasias mamárias (cisto nas mamas), mastodinia (dor mamária)⁽³⁷⁾. É de grande valia que exista um controle de qualidade desses medicamentos à base de progesterona. A farmacopeia brasileira sugere que o doseamento de progesterona em fármacos seja feita por espectrofotometria de absorção no ultravioleta⁽⁶⁾. Entretanto, na literatura pertinente poucos são os trabalhos relatando o desenvolvimento de métodos eficazes e ao mesmo tempo de baixo custo para a quantificação desse hormônio.

Nos próximos tópicos, serão reportadas algumas publicações sobre a quantificação de progesterona em diferentes matrizes por métodos cromatográficos, imunoenaios e eletroanalíticos. Alguns

trabalhos sobre o estudo eletroquímico da progesterona também serão relatados.

2.2.2 Determinação de progesterona por métodos cromatográficos e imunoensaios

Um dos primeiros trabalhos relatados na literatura para a determinação de progesterona foi desenvolvido por Handke *et al.*⁽³⁸⁾, em 1979, no qual foi descrita a utilização da cromatografia líquida - gasosa (GLC) com detector de captura de elétrons para estimar a concentração de progesterona em plasma de rato. Os autores asseguraram estabilidade e sensibilidade para o método desenvolvido e os valores de recuperação obtidos não passaram de 89,4%.

Raggi *et al.*⁽³⁹⁾ determinaram progesterona em formulações comerciais por dois métodos: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrofotometria derivada (DS). Por cromatografia líquida, a linearidade da curva de calibração compreendeu uma faixa de 25-500 ng mL⁻¹ e os limites de detecção e quantificação encontrados foram 10 ng mL⁻¹ e 20 ng mL⁻¹, respectivamente. Já os resultados por espectrofotometria também foram significativos: o limite de detecção obtido foi de 1,5 µg mL⁻¹ e de quantificação igual a 2,0 µg mL⁻¹. A linearidade da curva obtida pela adição de padrão ficou dentro da faixa de concentração de 2- 50 µg mL⁻¹. Os resultados para a quantificação de progesterona nos fármacos foram satisfatórios pelos dois métodos e mostraram-se concordantes em termos de precisão e exatidão.

Nogueira *et al.*⁽⁴⁰⁾ determinaram progesterona simultaneamente com outros hormônios esteróides em matrizes de água e urina. Os autores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC/DAD). A progesterona apresentou linearidade na faixa de 1,25 - 50 µg L⁻¹. O limite de detecção foi de 0,3 µg L⁻¹ e o valor encontrado para o limite de quantificação foi igual a 0,9 µg L⁻¹.

Jiang *et al.*⁽⁴¹⁾ determinaram esteróides em água utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC-UV). O limite de detecção obtido para a progesterona foi de 5,0 ng mL⁻¹ e a faixa linear de concentração ficou entre 50 -1600 ng mL⁻¹. Para a progesterona, a porcentagem de recuperação obtida pelo método desenvolvido foi de 99%.

Kawaguchi *et al.*⁽⁴²⁾ determinaram progesterona em amostras de soro humano. Os autores desenvolveram um método de extração do analito da matriz e o extrato obtido foi analisado por cromatografia

líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). O método respondeu de forma linear na faixa de concentração de 0,5 - 200 ng mL⁻¹. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram 0,1 ng mL⁻¹ e 0,5 ng mL⁻¹, respectivamente.

Já Sharma *et al.*⁽⁴³⁾ desenvolveram uma metodologia para determinação de progesterona e outros esteróides por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS). Para a metodologia desenvolvida, os autores encontraram um limite de detecção igual a 0,16 ng L⁻¹ e um limite de quantificação de 0,56 ng L⁻¹. O método foi aplicado para determinação de progesterona e outros esteróides em água de rio.

Trabalhos empregando imunoensaios também são encontrados para determinação de progesterona. Osawa *et al.*⁽⁴⁴⁾ desenvolveram um método de ensaio imunofluorimétrico de tempo resolvido (TR-FIA) para determinação de progesterona em leite de vaca. Um limite de detecção de 1,53 ng mL⁻¹ foi obtido e a exatidão das determinações de progesterona na amostras de leite foi comprovada com porcentagens de recuperação na faixa de 86,5% a 98,6%. Medel *et al.*⁽⁴⁵⁾ quantificaram progesterona em leite bovino utilizando imunoensaio fluorescente. A faixa linear para o método desenvolvido variou de 0,3 - 14,5 ng mL⁻¹ e o limite de detecção calculado foi de 0,1 ng mL⁻¹. Recuperações melhores que 90% foram constatadas para as determinações. Xu *et al.*⁽⁴⁶⁾ também determinaram progesterona em soro humano, porém utilizando a técnica de imunoensaio quimioluminescente enzimático (CLEIA). Um limite de detecção de 0,08 µg L⁻¹ foi alcançado e a recuperação para as determinações ficaram entre 94,4% e 101%, demonstrando a exatidão do método proposto.

2.2.3 Estudos eletroquímicos e determinações eletroanalíticas de progesterona

Dados eletroquímicos do hormônio progesterona já estavam relatados no início da década de 1970. Woodson *et al.*⁽⁴⁷⁾ investigaram os mecanismos eletroquímicos de vários compostos importantes no campo farmacêutico em solventes orgânicos apróticos utilizando o eletrodo gotejante de mercúrio. Os autores estudaram a resposta eletroquímica de 24 fármacos em acetonitrila/perclorato de tetrabutyl amônio pelos métodos de corrente direta (DC) e polarografia com corrente alternada (AC) de primeira e segunda harmônica. Para a progesterona foram encontrados os potenciais de pico de redução nos valores -1,91 V e -1,90V por polarografia AC de primeira e segunda

harmônica, respectivamente, e um potencial de meia onda no valor de -1,85 V por DC. Os limites de detecção para essas três técnicas foram encontrados: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ por DC, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ por polarografia AC de 1ª harmônica e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ por polarografia AC de 2ª harmônica.

Ainda na década de 1970, Oort *et al.*⁽⁴⁸⁾ mostraram as propriedades eletroanalíticas de vários corticosteróides inclusive para progesterona por análises polarográficas. As propriedades eletroquímicas desses compostos foram estudadas em diferentes eletrólitos suportes e diferentes valores de pH. Entre as conclusões obtidas pelos autores, uma bastante relevante foi a proposta de que a redução eletroquímica desses compostos envolva a redução da carbonila no agrupamento α,β - insaturado levando à formação de dímeros e álcoois.

Wang *et al.*⁽⁴⁹⁾, em 1985, estudaram o comportamento de alguns hormônios sexuais em eletrodo de gota pendente de mercúrio com voltametria de redissolução adsorptiva no modo pulso diferencial. O potencial escolhido para pré-concentrar o analito na superfície do eletrodo foi de -0,8 V por um determinado tempo em hidróxido de sódio $0,005 \text{ mol L}^{-1}$. Para a progesterona, um pico bem definido de redução apareceu em -1,52 V, o qual aumentava com a concentração e um pico mal definido de oxidação em -1,45 V, que permanecia constante à medida que a concentração variasse. Outra característica importante constatada foi a adsorção do hormônio na superfície do eletrodo. Para estudos quantitativos foram encontrados limites de detecção de $1,4 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,3 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para tempos de pré-concentração iguais a 20 e 10 minutos, respectivamente.

A redução eletroquímica da progesterona em eletrodo de mercúrio foi mostrada por Guidelli *et al.*⁽⁵⁰⁾, em 1988. Os autores investigaram a cinética e os mecanismos das reações no eletrodo quando a progesterona estava adsorvida e propuseram que em soluções tampão aquosas ($6,0 < \text{pH} < 7,5$) a progesterona se reduziria formando um dímero.

Hu *et al.*⁽⁵¹⁾, no início da década de 1990, determinaram progesterona por polarografia de pulso linear utilizando surfactantes. O eletrodo gotejante de mercúrio foi empregado como eletrodo de trabalho em meio alcalino (pH 9,0). Os autores observaram um aumento da corrente de pico quando pequenas concentrações do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTBA) eram adicionadas na solução da amostra. Por causa da adsorção da progesterona e do CTBA na superfície do eletrodo, a sensibilidade do método aumentou em torno de 40 vezes quando comparada com a ausência do surfactante. Um pico de redução

para progesterona foi registrado em -1,67 V. O limite de detecção obtido foi de $2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, e o método foi utilizado para determinações de progesterona em preparações farmacêuticas e em amostras de sangue de gestante.

Em 2008, um trabalho sobre a redução da progesterona foi realizado por Fernández *et al.* ⁽⁵²⁾ O mecanismo eletroquímico da redução monoeletrônica da progesterona em meio aprótico ($\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{PF}_6$ + acetonitrila) foi estudado por voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada empregando o eletrodo de carbono vítreo. Os autores constataram também a aparição de um pico de oxidação em velocidades de varredura altas, tornando o sistema, nessas velocidades, quase-reversível. Esse foi o primeiro trabalho para descrição detalhada do mecanismo da redução da progesterona empregando eletrodo de carbono vítreo em acetonitrila.

Em 2009, outro trabalho foi desenvolvido pelo mesmo grupo citado acima. Fernández *et al.* ⁽⁵³⁾ estudaram a adsorção da progesterona em carbono vítreo em solução tampão por voltametria de onda quadrada. Um pico de redução foi obtido em -1,65 V em pH 8,0 após a pré-concentração do hormônio em potencial de circuito aberto. Os autores mostraram uma dependência da adsorção da progesterona com o aumento da temperatura e sugeriram a isoterma de Frumkin para explicar os resultados obtidos. Valores para energia livre de Gibbs, entalpia e entropia da adsorção também foram expostos.

Trabalhos empregando biossensores para a determinação de progesterona são bastante encontrados na literatura. Um biossensor eletroquímico para determinação quantitativa do hormônio em leite de vaca foi desenvolvido por Xu *et al.* ⁽⁵⁴⁾ O sensor foi fabricado pelo depósito de um anticorpo monoclonal de anti-progesterona sobre eletrodo de carbono impresso e os autores obtiveram uma faixa linear de concentração que compreendeu valores entre 0-5 ng /mL. Kane *et al.* ⁽⁵⁵⁾ desenvolveram e validaram um biossensor para determinação de progesterona em leite de vaca. Uma faixa linear de concentração foi encontrada entre 0,5 – 50 ng mL⁻¹ e o limite de detecção obtido foi de 3,56 ng mL⁻¹. Hart *et al.* ⁽⁵⁶⁾ investigaram a utilização de eletrodo impresso de carbono como biossensor amperométrico descartável para detecção de progesterona e encontraram um limite de detecção de $1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ sugerindo uma aplicação para determinação de progesterona em fluidos biológicos. Kappel *et al.* ⁽⁵⁷⁾ desenvolveram um biossensor baseado em fluorescência por refletância interna total (TIRF) para detecção de progesterona em leite bovino. Os limites de detecção e quantificação alcançados foram 0,04 ng mL⁻¹ e 0,34 ng mL⁻¹,

respectivamente. Delwiche *et al.*⁽⁵⁸⁾ mediram o nível de progesterona durante a ordenha de vacas empregando um biossensor *on-line*, conseguindo uma faixa linear de concentração que variou de 0,1 – 5,0 ng L⁻¹, e Forster *et al.*⁽⁵⁹⁾ quantificaram progesterona em amostras de sangue utilizando biossensor óptico, obtendo uma linearidade que ficou dentro da faixa de 0,005 - 10 ng mL⁻¹, sendo o valor de 3 pmol L⁻¹ calculado para o limite de detecção.

2.3 Técnicas eletroanalíticas

2.3.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma técnica empregada geralmente quando se deseja obter informações qualitativas sobre o sistema, embora seja também bastante aplicada para fins quantitativos. É uma ferramenta versátil para investigar o comportamento eletroquímico de diversas moléculas, que fornece informações termodinâmicas sobre os processos redox. Por apresentar relativa simplicidade e ao mesmo tempo fornecer rapidamente diversas informações, a voltametria cíclica é muito utilizada. Geralmente para estudos eletroanalíticos, deve-se recorrer primeiramente à voltametria cíclica em que se obtém rapidamente dados sobre o sistema, como a localização dos potenciais de redução e oxidação das espécies eletroativas.

Em voltametria cíclica, a aplicação do potencial ocorre na forma triangular, na qual um potencial inicial (E_i) é varrido até um potencial final (E_f). A partir desse momento, a direção da varredura inverte em sentido a um potencial qualquer, podendo ser o E_i , formando um triângulo como mostra a Figura 3. Durante a variação de potencial, a velocidade de varredura deve ser mantida constante, o sistema, em repouso (sem agitação), e o eletrodo de trabalho, estacionário. Outra informação importante é que os potenciais aplicados devem ser escolhidos de forma que se observem as respostas eletroquímicas do composto a ser investigado durante a varredura de potencial. Na prática, a aplicação desse potencial em forma de triângulo resulta em um gráfico de corrente (i) versus potencial (E), denominado voltamograma cíclico (Figura 4).^{(60), (61)}

No caso da Figura 4, quando a variação de potencial ocorre inicialmente no sentido de regiões mais positivas (varredura direta), ocorre a oxidação da espécie eletroativa. Essa oxidação resulta em um pico de corrente anódica (i_{pa}) que é proporcional à concentração da espécie eletroativa. Esse pico ocorre em um determinado potencial,

denominado potencial de oxidação (E_{po}). Se a variação de potencial ocorre no sentido contrário (varredura inversa), observa-se a redução da espécie eletroativa, representada por um pico de corrente catódica (i_{pc}) em um potencial, chamado de potencial de redução (E_{pr}). A Figura 4 exibe um caso de um sistema reversível, no qual todas as espécies oxidadas durante a varredura direta irão reduzir na varredura inversa.

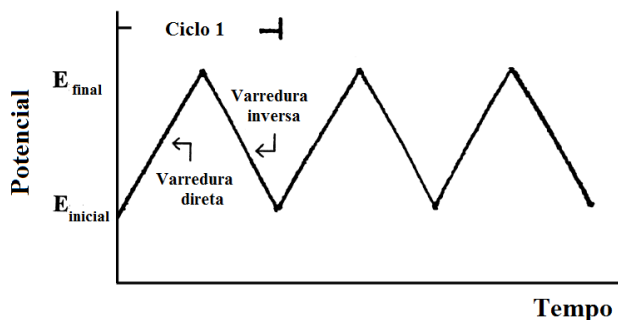


Figura 3. Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo para voltametria cíclica.

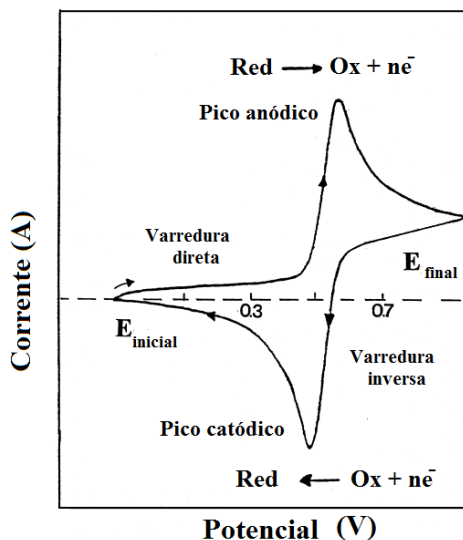


Figura 4. Voltamograma cíclico para um sistema reversível no qual Ox representa a espécie oxidada e Red, a espécie reduzida.

2.3.1.1 Reversibilidade dos sistemas estudados por voltametria cíclica

2.3.1.1.1 Sistemas reversíveis

Para uma reação reversível, a etapa de transferência de massa controla a velocidade de reação, pois a velocidade de transferência de elétrons é elevada, ou seja, a velocidade da reação se torna suficientemente alta a fim de obter um equilíbrio dinâmico na interface.
(62)

A intensidade de corrente é dada pela equação de Randles-Sevcik (Equação 3).

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} ACD^{1/2} \nu^{1/2} \quad (3)$$

No qual:

n é o número de mols elétrons envolvidos no processo,

A é a área do eletrodo (cm^2),

D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$),

C é a concentração da espécie eletroativa no interior da solução (mol cm^{-3})

ν é a velocidade de varredura (V s^{-1})

Para sistemas reversíveis, são relatados alguns diagnósticos:

- O resultado da divisão do valor da corrente de pico anódica (i_{pa}) sobre a corrente de pico catódico (i_{pc}) deve ser igual ou próximo a 1, ou seja, $i_{pa}/i_{pc} = 1$, não dependendo da velocidade de varredura. (62), (63)
- O módulo dos valores de corrente anódica e catódica devem ser iguais, independentemente da velocidade de varredura. (62), (63)
- O valor da separação entre os potenciais de oxidação e redução, ou seja, $\Delta E_p = E_{po} - E_{pr}$, deve apresentar valor de 59 mV/ n , sendo n o número de mols de elétrons. (62), (63)

2.3.1.1.2 Sistemas irreversíveis

Nos sistemas irreversíveis, a velocidade da reação é controlada pela transferência de elétrons. Diferentemente dos processos reversíveis, as concentrações das espécies reduzidas e oxidadas não serão mais função do potencial, não apresentando assim um comportamento Nernstiano.

A intensidade de corrente é descrita pela Equação 4:

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (\alpha n)^{1/2} ACD^{1/2} \nu^{1/2} \quad (4)$$

na qual α é o coeficiente de transferência de carga.

Abaixo seguem algumas características associadas à irreversibilidade do sistema:

- Ausência de pico na varredura reversa. ^{(62), (63)}
- O potencial de pico desloca com a velocidade de varredura. ^{(62), (63)}
- O potencial de pico varia 30 mV/∆n quando a velocidade de varredura aumenta em torno de 10 vezes. ^{(62), (63)}

2.3.2 Voltametria de onda quadrada

Em virtude do avanço tecnológico resultante da evolução da informática, as técnicas eletroanalíticas sofreram grande aprimoramento. Na década de 1950, as técnicas de pulso começaram a surgir e substituir as técnicas até então utilizadas. O desenvolvimento das técnicas pulsadas foi considerado um grande avanço, pois com elas é possível obter baixíssimos limites de detecção quando comparados às técnicas não pulsadas. Essa alta sensibilidade das técnicas de pulso deve-se à leitura da corrente ocorrer no momento que a corrente capacitiva (não faradaica) é mínima. ⁽⁶⁴⁾

A voltametria de onda quadrada (SWV) é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis, e os limites de detecção obtidos podem ser comparados às técnicas espectroscópicas e cromatográficas. ⁽⁶⁴⁾

Em 1953, Barker e colaboradores desenvolveram a SWV, a fim de solucionar problemas, como a alta corrente capacitiva obtida nas análises polarográficas. Com o passar do tempo, a técnica de onda quadrada foi sendo modificada e melhorada e hoje é possível investigar o mecanismo e a cinética de processos redox de compostos, sob diversas condições.

Na SWV, o potencial é aplicado na forma de uma onda quadrada simétrica sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada, sendo que um pulso de potencial é aplicado no sentido direto (direção do pulso é na mesma direção da variação de potencial), e depois outro pulso de potencial é aplicado no sentido inverso (direção do pulso é contrária à direção da variação de potencial), formando um ciclo como mostra a Figura 5, no qual ΔE_s é o incremento do potencial da rampa, a é a amplitude de pulso, τ é o tempo de um ciclo e $1/\tau$ (f) a frequência do pulso.

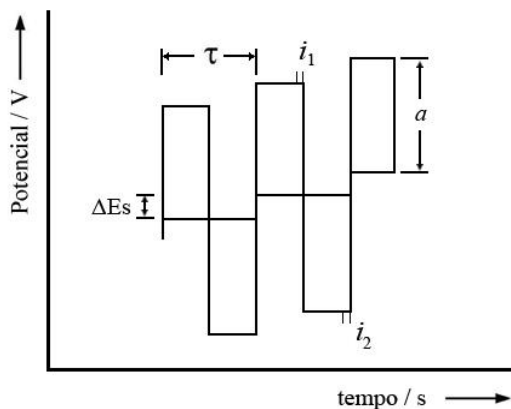


Figura 5. Forma de aplicação de pulsos em voltametria de onda quadrada.

Nesta técnica, as correntes são medidas duas vezes, uma ao final do pulso direto (direção do pulso é igual à direção da variação de potencial) e outra ao final do pulso reverso (direção do pulso é contrária à direção da variação de potencial). O sinal obtido da intensidade de corrente é a resultante da leitura dessas duas correntes. A Figura 6 exibe os voltamogramas associados ao (1) sistema reversível e ao (2) sistema irreversível com a separação das correntes inversa, direta e resultante.

(64)

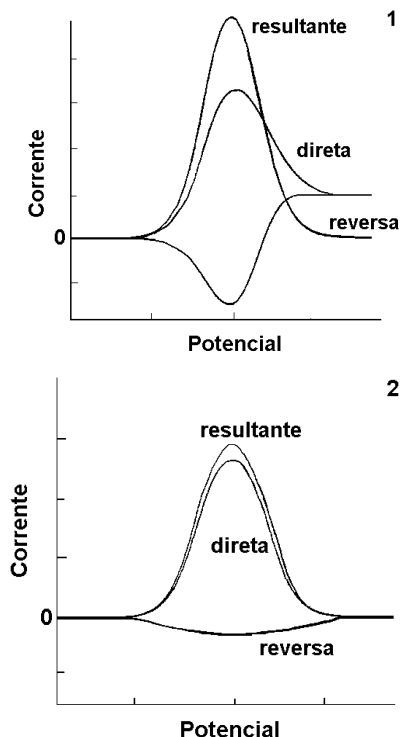


Figura 6. Voltamogramas de onda quadrada para um processo redox de (1) um sistema reversível (2) sistema irreversível. Fonte: Souza, Machado e Avaca, 2003.

A corrente (i_p) e o potencial (E_p) de pico obtidos em SWV podem fornecer informações sobre a reversibilidade do sistema. Para sistemas reversíveis, a corrente de pico é proporcional à raiz quadrada da frequência, já para sistemas irreversíveis, a corrente varia linearmente com o aumento da frequência de aplicação de pulsos de potencial. Para sistemas quase-reversíveis, a corrente de pico não exibe relação linear com a frequência. As inclinações obtidas de gráficos de potencial em função da frequência também oferecem informações sobre a reversibilidade. Para um sistema reversível sem adsorção do produto, o coeficiente angular (Θ) obtido tem o valor de $-2,3 RT/2nF$, e para o sistema reversível com adsorção do produto e reagente, a relação entre o potencial e o logaritmo da frequência não é linear. Sistemas irreversíveis apresentam um valor de $-2,3RT/nF$ para o coeficiente

angular ⁽⁶⁴⁾. Na Tabela 2 são resumidas as principais características dos sistemas eletroquímicos em relação à reversibilidade.

Tabela 2- Características sobre a reversibilidade do sistema por meio de dados obtidos por voltametria de onda quadrada

Sistema	Relação de f e i_p	Relação de $\log f$ vs E_p
Reversível	$i_p = kf^{1/2}$	Sem adsorção do produto: $\Theta = -2,3RT/2nF$ Com adsorção do produto e do reagente: não linear,
Irreversível	$i_p = kf$	$\Theta = -2,3RT/\alpha nF$
Quase-reversível	não linear	não linear

Fonte: Souza, Machado e Avaca, 2003.

2.3.3 Voltametria de redissolução

A voltametria de redissolução é uma técnica utilizada para a detecção de analitos em níveis traço, pois apresenta a vantagem de atingir limites de detecção bastante baixos. A metodologia empregada pelas técnicas de redissolução consiste na aplicação de um potencial por um certo tempo para pré-concentrar o analito na superfície do eletrodo a fim de aumentar a corrente faradaica, baixando os limites de detecção. ^{(60), (61)}

A técnica de redissolução possui duas etapas distintas. Primeiramente, o analito é pré-concentrado na superfície do eletrodo de trabalho por meio da eletrodeposição por redução, oxidação ou adsorção da espécie de interesse, aplicando ou não um potencial estabelecido. A segunda etapa consiste na redissolução do analito pré-concentrado na superfície do eletrodo para a solução, através da aplicação de uma variação de potencial. As técnicas de redissolução podem ser divididas basicamente em três tipos: anódica, catódica e adsortiva.

A voltametria de redissolução anódica é bastante empregada para a análise de íons metálicos. Inicialmente, o metal é reduzido e eletrodepositado na superfície do eletrodo por causa da aplicação de um potencial negativo durante um tempo adequado na superfície do

eletrodo, e, depois de uma etapa de repouso, a etapa de redissolução é realizada aplicando uma variação de potencial no sentido de potenciais mais positivos. Os metais pré-concentrados na superfície do eletrodo são oxidados, gerando picos de corrente anódica proporcional a sua concentração.

A técnica de voltametria de redissolução catódica consiste na aplicação de um potencial positivo sobre o eletrodo, imerso em solução contendo o analito de interesse, fazendo com que esse se oxide, formando um sal insolúvel na superfície do eletrodo. Após esta etapa, uma variação de potencial no sentido de potenciais mais negativos reduz o analito pré-concentrado na superfície do eletrodo, resultando no aparecimento de um pico de corrente catódica.

2.3.3.1 Voltametria de redissolução adsortiva

A voltametria de redissolução adsortiva é bastante semelhante às voltametrias de redissolução anódica e catódica, porém, na etapa de pré-concentração do analito, a adsorção do analito na superfície do eletrodo é física e não consequência de um processo eletroquímico. Depois de um tempo de pré-concentração, acontece a redissolução do analito pré-concentrado na superfície do eletrodo para a solução por meio de uma aplicação de variação de potencial.

As técnicas de redissolução adsortivas quando associadas às técnicas de pulso ganham muita sensibilidade. Por isso, para obter melhoras nos resultados, os parâmetros como potencial de pré-concentração (E_{pc}) e tempo de pré-concentração (t_{pc}) devem ser cuidadosamente otimizados.

A agitação da solução durante a etapa de pré-concentração é um fator de extrema importância, pelo fato de que o transporte de massa por convecção mantém a mesma concentração da espécie, tanto na superfície do eletrodo quanto no seio da solução. Isto permite que uma maior “massa” do analito seja depositada em um determinado tempo, do que na ausência de agitação, onde o transporte de massa acontece por difusão.

Além dessa técnica ser bastante utilizada para análise de compostos orgânicos, é também empregada para íons metálicos complexados, como mostra a Figura 7. Nota-se que durante a etapa de pré-concentração o íon metálico é complexado (Equação 5) e posteriormente é adsorvido na superfície do eletrodo (Equação 6). Após a etapa de pré-concentração, a redissolução é realizada através da aplicação de uma variação de potencial (Equação 7).

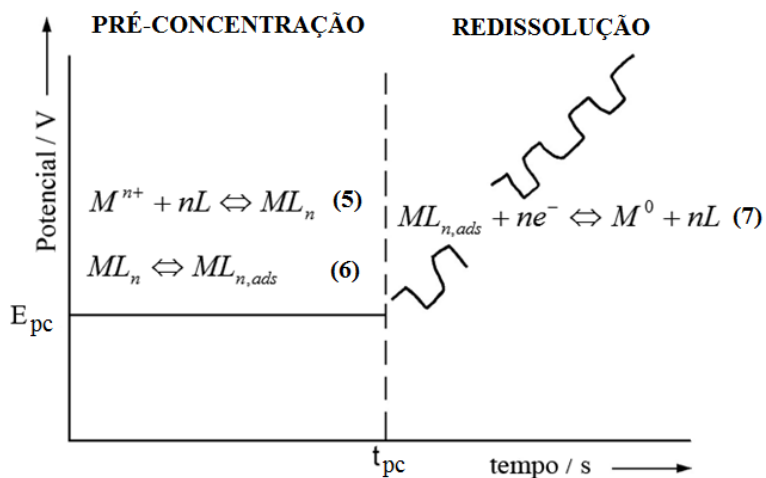


Figura 7. Esquema do procedimento de pré-concentração por adsorção e redissolução catódica usada na determinação de íons metálicos complexados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do hormônio progesterona empregando o eletrodo de filme de bismuto depositado na forma *ex situ* sobre um substrato de carbono vítreo.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Deposição ex situ do filme de bismuto em substrato de carbono vítreo e estudo do comportamento eletroquímico da progesterona.

- Estudar o comportamento eletroquímico do Bi(III) em HCl 1,0 mol L⁻¹ sobre eletrodo de carbono vítreo e otimizar os parâmetros para a deposição *ex situ* do filme: potencial de deposição, tempo de deposição.
- Estudar o comportamento eletroquímico da progesterona.

3.2.2 Desenvolvimento e aplicação da metodologia

- Escolher a técnica de trabalho.
- Otimizar os parâmetros para a técnica escolhida.
- Construir a curva de calibração.
- Estudar os possíveis interferentes na determinação da progesterona nos fármacos.
- Quantificar a progesterona nas amostras farmacêuticas.
- Obter a porcentagem de recuperação.
- Quantificar a progesterona através do método comparativo e tratar os dados estatisticamente.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes, soluções e amostras

4.1.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados para esse trabalho foram de alto grau de pureza obtidos da Sigma: $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, HCl , NaOH , LiOH , CH_3COOH , H_3BO_3 , Na_2HPO_4 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, H_3PO_4 e progesterona. Todos esses reagentes foram utilizados sem purificação prévia.

4.1.2 Soluções

A solução estoque de progesterona $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de uma quantidade do hormônio em etanol, estocada e mantida sob refrigeração até sua utilização. Diluições com etanol até as concentrações desejadas foram preparadas imediatamente antes das análises, partindo-se da solução estoque ou pela adição de alíquotas da solução estoque diretamente na célula eletroquímica. A solução estoque apresentou estabilidade durante todo o tempo de armazenagem, que variou de 1 a 2 meses.

Para o estudo do eletrólito suporte foram preparadas as soluções de NaOH , LiOH , Ringer (Na_2HPO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e tampão Britton-Robinson (CH_3COOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; H_3BO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; H_3PO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), todas na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 12,0. Uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada para o ajuste de pH do tampão B-R. As soluções foram armazenadas sob refrigeração.

A solução de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada para a formação do filme de bismuto na superfície do carbono vítreo por meio do método *ex situ*.

4.1.3 Amostras

As amostras contendo progesterona - o gel (amostra A), o creme (amostra B) e loção capilar (amostra C) - foram cedidas por uma farmácia de manipulação localizada na cidade de Guarapuava/PR-Brasil, e o fármaco Utrogestan® (amostra D) foi adquirido em uma farmácia na região de Florianópolis/SC-Brasil.

4.2 Equipamentos

4.2.1 Experimentos voltamétricos

Voltamogramas cíclicos e voltamogramas de onda quadrada foram obtidos em um potenciostato/galvanostato EG & G PARCTM, modelo 263 A, em conjunto com o *software* M270 acoplado a um computador comercial.

Foram utilizadas duas células eletroquímicas de 25 mL com três eletrodos, sendo a primeira para a formação do filme e a segunda para a obtenção dos voltamogramas para o estudo da progesterona. Nas duas células, o eletrodo de filme de bismuto em substrato de carbono vítreo ($A = 0,07 \text{ cm}^2$) foi utilizado como eletrodo de trabalho, fio de platina, como eletrodo auxiliar, e Ag/AgCl, como eletrodo de referência. Todos os potenciais foram medidos versus o eletrodo de referência.

Todas as medidas de pH foram realizadas em pHmetro ORION modelo 720 A. A água purificada foi proveniente de um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, USA). Um ultrassom METASOM-14 foi utilizado para a dissolução dos reagentes e para limpeza do eletrodo de carbono vítreo e um agitador magnético DIST, modelo DI-03, foi utilizado para agitação da solução quando necessário.

4.2.2 Experimentos espectrofotométricos de absorção no ultravioleta

Os espectros de absorção no ultravioleta foram obtidos em um espectrofotômetro Varian 50 Bio no comprimento de onda de 240 nm, utilizando-se de cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Experimentos voltamétricos

4.3.1.1 Obtenção do eletrodo de filme de bismuto

A superfície do eletrodo de carbono vítreo (GCE) foi utilizada como substrato para a deposição do filme de bismuto. Antes de cada deposição do filme, o eletrodo de carbono vítreo foi polido mecanicamente em alumina de granulação 0,5 e 0,05 μm , respectivamente, seguido de banho de ultrassom por 3 minutos. Após a inserção do GCE na célula eletroquímica onde estava a solução de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, a deposição foi

realizada pela aplicação de um potencial de -0,3 V por 12 s sob agitação constante. Logo após a formação do filme, o eletrodo foi transferido para outra célula, onde os experimentos com o hormônio progesterona foram realizados.

4.3.1.2 Comportamento eletroquímico e desenvolvimento da metodologia eletroanalítica

O eletrodo de filme de bismuto, depois de preparado, foi transferido para outra célula de trabalho (25 mL) contendo o eletrólito suporte. Em seguida, voltamogramas do branco (somente o eletrólito suporte, sem a progesterona) foram registrados. Após registrados os voltamogramas do branco, uma alíquota proveniente da solução estoque da progesterona foi adicionada ao eletrólito suporte e então os voltamogramas foram obtidos. A voltametria cíclica foi empregada a fim de se obterem dados sobre o comportamento eletroquímico do hormônio progesterona e a voltametria de onda quadrada foi usada para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica e para a determinação da progesterona em formulações farmacêuticas.

4.3.1.3 Determinação da progesterona nas amostras

As descrições abaixo relatam os procedimentos de preparo das amostras utilizadas nas determinações.

O rótulo do gel de progesterona (amostra A) indicou uma quantidade de 0,45 g de progesterona para 50 g do produto. Foram pesados 5 g do gel e em seguida a essa quantia foram adicionadas 20 mL de etanol. A solução foi filtrada e depois o volume foi completado para 50 mL com etanol. Uma quantidade de 8,0 mL dessa amostra foi diluída em 50 mL de etanol e foi dessa última solução preparada que uma alíquota de 75 μ L foi retirada para colocá-la na célula eletroquímica (25 mL).

O creme manipulado com progesterona (amostra B) indicava na embalagem a quantidade de 0,75 g do hormônio em 50 g do creme. Uma massa de 11,5 g foi diluída em 50 mL de etanol. Dessa solução, 750 μ L foram retirados e diluídos em 50 mL de etanol. Foram utilizados 100 μ L dessa última solução para adição na célula eletroquímica (25 mL).

A loção capilar (amostra C) destacava no rótulo uma quantidade de 1 g do hormônio para 50 mL do produto. Uma alíquota de 630 μ L da loção foi diluída em 50 mL de etanol, e, dessa solução, uma alíquota de 125 μ L foi colocada na célula eletroquímica (25 mL).

O medicamento Utrogestan® (amostra D) anuncia 100 mg de progesterona por comprimido. Pesou-se 1 comprimido de progesterona, o qual foi diluído em 50 mL de etanol. Dessa solução, uma quantidade de 2,5 mL foi diluída para um volume de 50 mL. Por fim, 200 μ L dessa última solução preparada foram adicionados na célula eletroquímica.

4.3.2 Experimentos espectrofotométricos

Baseado na farmacopeia brasileira, a espectrofotometria de absorção no ultravioleta foi utilizada como método comparativo objetivando a validação do método desenvolvido neste trabalho para determinação de progesterona em fármacos.

A curva de calibração para o padrão de progesterona foi obtida utilizando-se a solução estoque de progesterona que foi diluída para alcançar concentrações na faixa de 12,5 – 57,8 μ mol L⁻¹ na cubeta com volume de 2 mL de etanol. A absorbância foi medida monitorando-se o máximo de sinal em comprimentos de onda de 240 nm utilizando o etanol como branco.

As quantificações da progesterona nas amostras farmacêuticas foram realizadas pelo método do padrão externo onde 2 mL de cada amostra (preparada como descrito na seção 4.3.1.3) foram colocados na cubeta, que, posteriormente foi submetida à análise espectrofotométrica, registrando-se espectros na região do ultravioleta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados e a discussão desse trabalho e encontra-se dividido em duas partes fundamentais. A primeira mostra a preparação do EFBi pelo método *ex situ* e alguns estudos sobre comportamento eletroquímico da progesterona; a segunda parte relata o desenvolvimento do método eletroanalítico para a determinação da progesterona em amostras farmacêuticas.

5.1 Preparo do EFBi e estudo do comportamento eletroquímico da progesterona

5.1.1 Preparo do EFBi por eletrodeposição *ex situ* e sua resposta diante da progesterona

Inicialmente, foi estudado o comportamento eletroquímico de íons Bi(III) diante do eletrodo de carbono vítreo em HCl 1,0 mol L⁻¹. Como a solubilidade do Bi(NO₃)₃ e dos possíveis complexos resultantes da hidrólise dos íons Bi(III) é maior em meio ácido, esse meio é bastante utilizado para preparação do EFBi no modo *ex situ*.

Na Figura 8 observa-se o voltamograma cíclico completo para o Bi(NO₃)₃ em HCl 1,0 mol L⁻¹ após a aplicação de potencial no GCE na direção negativa de 0,8 a -0,8 V, seguida da varredura de potencial na direção positiva até 0,8 V. O voltamograma cíclico obtido para uma solução de Bi(NO₃)₃ é caracterizado por dois picos bem definidos, um em - 0,21 V na região de redução e outro em 0,09 V na região de oxidação. Esses dados sugerem que um potencial mais negativo que - 0,21 precisa ser aplicado para que haja deposição de Bi metálico na superfície do carbono vítreo.

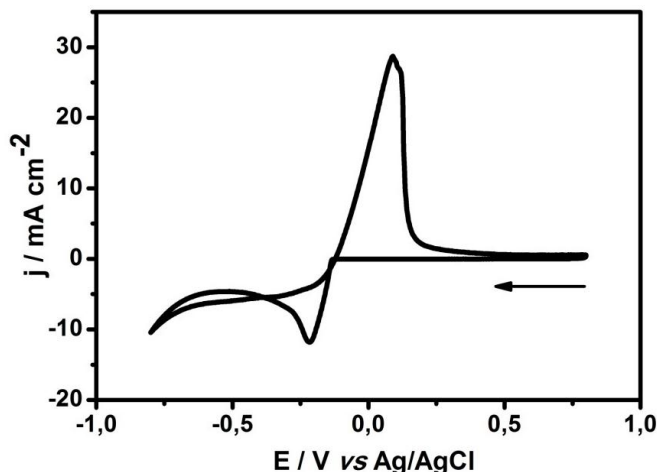


Figura 8. Voltamograma cíclico para Bi (III) $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ sobre GCE, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Os parâmetros de preparação do EFBi para determinação de progesterona, como potencial de deposição (E_d) e tempo de deposição (t_d), foram otimizados com o objetivo de obter uma melhor resposta para a redução do hormônio (Figura 9). A Figura 9A mostra o estudo do potencial de deposição, onde os valores de potenciais aplicados no eletrodo de GCE imerso na solução HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ contendo íons Bi(III) $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ foram variados de $-0,3 \text{ V}$ a $-0,6 \text{ V}$ durante um tempo de 8 s. Os potenciais de deposição para otimização foram escolhidos em virtude de a redução do bismuto ocorrer em $-0,21 \text{ V}$, como mostrado anteriormente (Figura 8). Observou-se que, conforme o potencial ficava mais negativo, a densidade de corrente para a redução da progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ diminuía, adquirindo uma tendência constante. Logo, o potencial escolhido foi $-0,3 \text{ V}$, pois nesse potencial a resposta do hormônio apresentou maior valor de densidade de corrente e melhor perfil voltamétrico (dado não mostrado). Após escolhido o potencial de deposição, variou-se o tempo de deposição de 4 a 14 segundos (Figura 9B) e constatou-se que os valores de densidade de corrente aumentaram com o tempo até 12 s. Então 12 s foi o tempo escolhido, pois, além de apresentar um alto valor de densidade de corrente, um bom perfil voltamétrico para a redução da progesterona foi evidenciado. Foi observado que, para tempos maiores que 12 s, o filme de bismuto começava a se desintegrar na superfície do eletrodo utilizado

como substrato. Isso justifica o decréscimo da densidade de corrente para tempos maiores que 12 s.

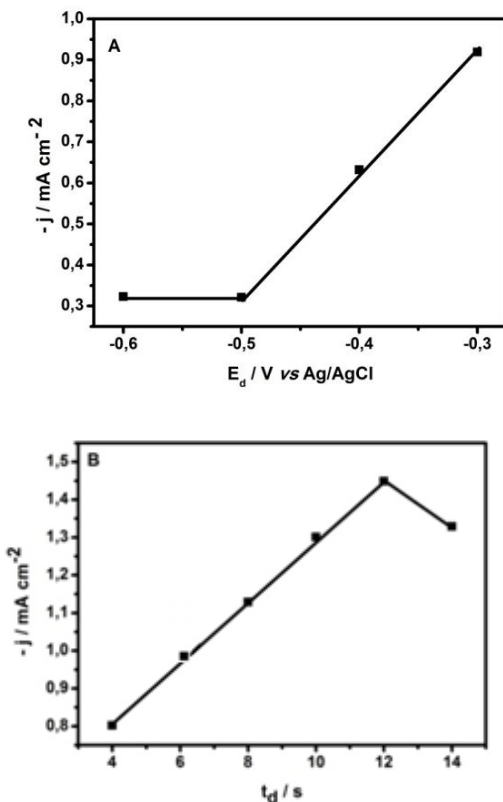


Figura 9. Influência dos parâmetros de preparação *ex situ* do EFBi: (A) potencial de deposição, $t_d = 8$ s, (B) tempo de deposição, $E_d = -0,3$ V na densidade de corrente da progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) por voltametria cíclica $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

A fim de evidenciar que a sensibilidade do EFBi em relação à progesterona é maior que a do GCE (utilizado como substrato), voltamogramas por SWV para a progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12) em EFBi e GCE foram realizados e são mostrados na Figura 10, na qual os voltamogramas para brancos são exibidos em **a** e **c** para GCE e EFBi, respectivamente, e os voltamogramas para o sinal da progesterona em GCE e EFBi são

mostrados em **b** e **d**, respectivamente. É notável a diferença de intensidade da densidade de corrente resultante. O filme de bismuto aumentou o sinal em torno de seis vezes quando comparado ao eletrodo de carbono vítreo.

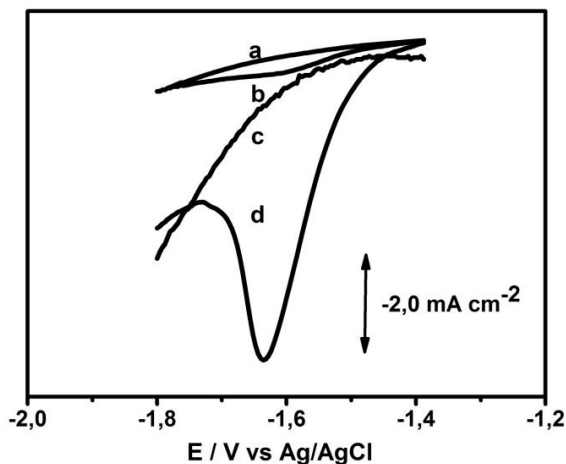


Figura 10. Voltamogramas de onda quadrada para (a) GCE e (c) EFBi em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) e (b e d) na presença de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, $f = 50 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

5.1.2 Comportamento eletroquímico da progesterona por voltametria cíclica

Nas seções seguintes foram estudados alguns aspectos sobre o comportamento eletroquímico da progesterona, bem como a otimização de alguns parâmetros importantes para desenvolvimento da metodologia. Todos os resultados nessa seção foram obtidos por voltametria cíclica.

5.1.2.1 Comportamento ciclovoltamétrico da progesterona

Após a etapa de preparação do eletrodo de filme de bismuto, o comportamento eletroquímico da progesterona sobre o EFBi foi obtido por voltametria cíclica.

Inicialmente, foi estudado o comportamento ciclovoltagemétrico da progesterona em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) utilizando o EFBi. Na Figura 11, observa-se em **a** o voltamograma cíclico completo após a varredura de potencial na direção negativa de $-1,0 \text{ V}$ a $-1,8 \text{ V}$ seguida da varredura de potencial na direção positiva até $-1,0 \text{ V}$ para o branco (somente o eletrólito suporte) e em **b** o voltamograma completo obtido para uma solução de tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) contendo progesterona $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, o qual é caracterizado por um pico bem definido na região de redução, aproximadamente em $-1,68 \text{ V}$, e um pico pouco definido na região de oxidação, em $-1,47 \text{ V}$. Porém, esses picos não podem ser considerados como um par redox reversível, pois a separação entre eles de 210 mV é maior que $60/n \text{ mV}$, valor previsto teoricamente para sistemas reversíveis.⁽⁶²⁾

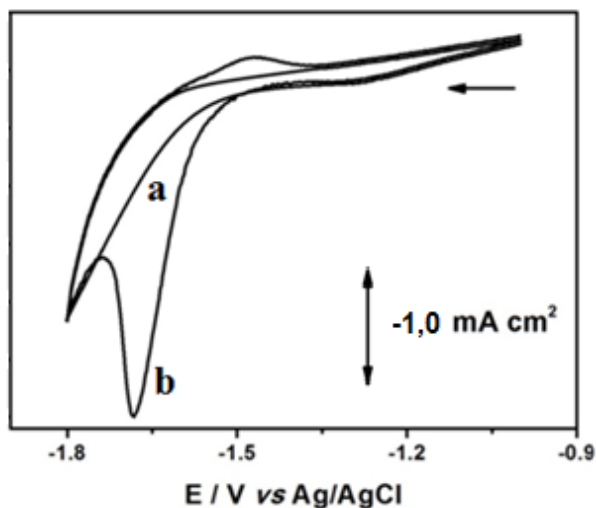


Figura 11. Voltamogramas cíclicos completo para: (a) branco, (b) progesterona $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$, sobre EFBi.

5.1.2.2 Influência das varreduras sucessivas e otimização dos parâmetros de pré-concentração

Outra maneira para se obter informações sobre o comportamento ou mecanismo de um composto orgânico é a realização

de varreduras sucessivas, na qual se compara o primeiro voltamograma registrado com os demais.

A característica adsortiva do hormônio foi identificada através do registro de voltamogramas cíclicos sucessivos para a redução de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), na velocidade de 200 mV s^{-1} (Figura 12). O voltamograma **a** refere-se ao primeiro ciclo, que possui um pico catódico que decai acentuadamente quando comparado ao voltamograma referente ao décimo ciclo feito sucessivamente (voltamograma **b**). Isso significa que a superfície do eletrodo fica bloqueada pela adsorção da progesterona, impedindo que novas moléculas cheguem à superfície. Por esse motivo ocorre o decréscimo na densidade de corrente catódica.

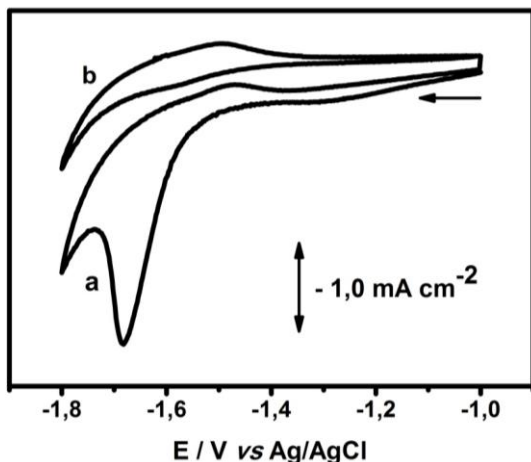


Figura 12. Voltamogramas cíclicos para a progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), sendo a) o primeiro ciclo e b) o décimo ciclo, sobre EFBi, $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Em virtude da adsorção da progesterona na superfície do EFBi faz-se necessária a realização de uma etapa de pré-concentração antes do ensaio voltamétrico, acarretando um aumento da sensibilidade do método, que, por consequência, irá fornecer baixos limites de detecção, fatores importantes para o desenvolvimento da metodologia. Para isso, é de extrema importância a otimização dos parâmetros de pré-concentração, como potencial de pré-concentração (E_{pc}) e tempo de pré-concentração (t_{pc}).

A Figura 13 mostra a influência da variação dos parâmetros de pré-concentração como E_{pc} e t_{pc} na resposta da densidade de corrente

catódica (j_{pc}). Os dados foram obtidos por voltametria cíclica, $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) para uma solução de progesterona $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em EFBi.

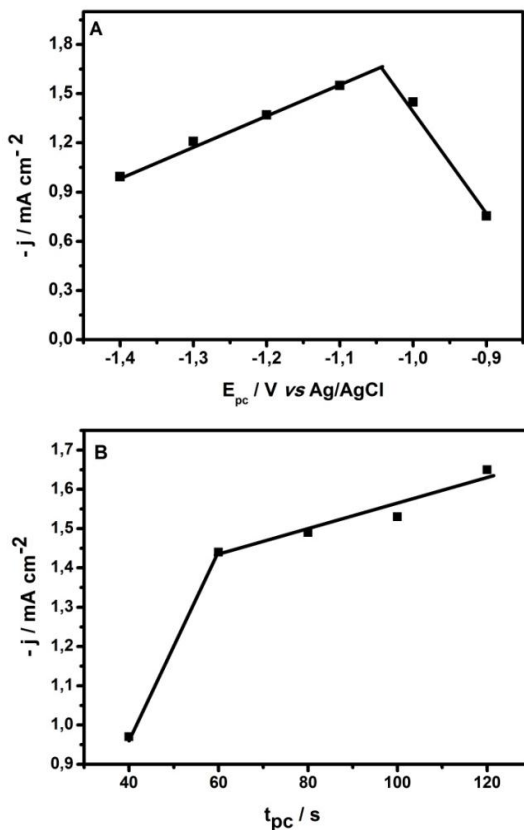


Figura 13. Influência dos parâmetros de pré-concentração: (A) potencial de pré-concentração, $t_{pc} = 60 \text{ s}$, (B) tempo de pré-concentração, $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, na densidade de corrente da progesterona $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) por voltametria cíclica ($\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$), utilizando o EFBi.

Na Figura 13A observa-se a variação de E_{pc} na faixa de $-0,9 \text{ V}$ a $-1,4 \text{ V}$ onde foi mantido $t_{pc} = 60 \text{ s}$. Nota-se um aumento de j_{pc} com E_{pc} para a progesterona na faixa de $-0,9$ a $-1,1 \text{ V}$. Acima de $-1,1 \text{ V}$ visualiza-se um decréscimo da densidade de corrente catódica. Portanto, escolheu-se o potencial de pré-concentração de $-1,0 \text{ V}$, pois, neste valor, o

voltamograma apresentou boa concordância entre o perfil voltamétrico (dado não mostrado) e o valor de densidade de corrente. Após fixado o potencial, variou-se o t_{pc} na faixa de 40-120 s, como se pode observar na Figura 13B. Constatou-se que houve um aumento nos valores de j_{pc} com o aumento do t_{pc} , indicando um acréscimo de progesterona na superfície do eletrodo, porém, para fins eletroanalíticos, optou-se por um tempo razoavelmente curto, igual a 60 s.

Para fins de visualização do efeito de pré-concentração, a Figura 14 mostra a comparação entre o sinal da redução da progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) no EFBi (a) sem pré-concentração e (b) com pré-concentração utilizando voltametria de onda quadrada ($f = 50 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$). Pode-se notar um aumento significativo no valor da resultante de densidade de corrente catódica e uma melhor definição de pico quando comparado à resposta da progesterona na ausência de pré-concentração.

Portanto, para prosseguir com os estudos, o E_{pc} e t_{pc} escolhidos foram $-1,0 \text{ V}$ e 60 s , respectivamente.

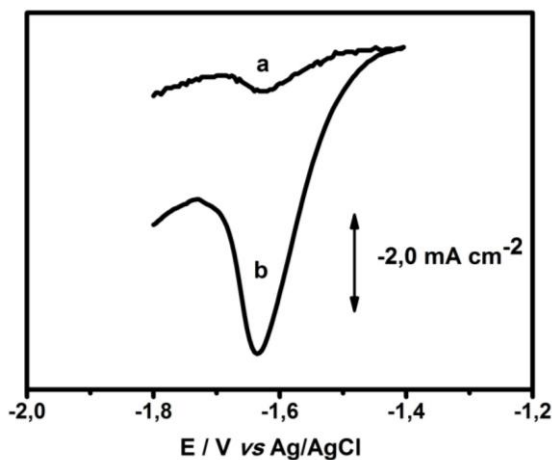


Figura 14. Voltamogramas de onda quadrada para progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$: (a) sem pré-concentração e (b) com pré-concentração $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), $f = 50 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ utilizando o EFBi.

5.1.2.3 Influência do pH e seleção do eletrólito suporte

Além da otimização dos parâmetros de pré-concentração, outro fator importante a ser estudado para propósitos quantitativos é a influência do pH na resposta da densidade de corrente e do potencial de pico para o processo de redução da progesterona.

Primeiramente, investigou-se a redução da progesterona em diferentes faixas de pH (2,0-12,0). Para isso, utilizou-se tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, que permite uma ampla variação de pH. Entretanto, constatou-se que para valores de pH menores que 8,0 a redução da progesterona não foi evidenciada. Por isso, a faixa de pH estudada foi de 8,0 a 12,0.

A Figura 15 mostra o estudo do pH por voltametria cíclica na velocidade de varredura de 200 mV s^{-1} . Observa-se na Figura 15A os perfis voltamétricos para a redução da progesterona em diferentes valores de pH. Constata-se o deslocamento dos picos de redução para potenciais mais negativos com o aumento do pH como também se notam melhores perfis voltamétricos para valores de pH maiores. A Figura 15B exibe a variação do E_{pr} em função do pH. Confirma-se o deslocamento do E_{pr} para valores mais negativos com o aumento do pH na faixa de 8,0 - 10,5. Na faixa de 10,5 - 12,0 os valores de E_{pr} não apresentam deslocamento considerável. A influência do pH na densidade de corrente catódica é mostrada na Figura 15C, na qual um máximo de j_{pc} é obtido em um valor de pH igual a 12,0. Valores abaixo do pH 12,0 exibem uma diminuição gradativa na intensidade de densidade de corrente.

Considerando que além da intensidade de densidade de corrente ser máxima em pH 12,0, a redução da progesterona apresentou um perfil voltamétrico bem definido, logo, esta condição foi adotada para propósitos analíticos quantitativos.

Após a escolha do pH adequado, variou-se a composição dos eletrólitos suportes. A etapa de escolha do eletrólito suporte é de extrema importância para o desenvolvimento do método eletroanalítico, pois a sua presença ocasiona efeitos nos processos termodinâmicos e cinéticos da transferência de carga e adsorção na superfície do eletrodo⁽⁶⁵⁾. Foram testados tampão B-R, NaOH, solução Ringer e LiOH, todas as soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 12,0. A Figura 16 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para esses diferentes eletrólitos na presença de progesterona $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

Em todos os voltamogramas cíclicos, exceto em tampão B-R, um pico de redução foi observado quando feita uma varredura de -1,0 V a -1,8 V, voltando para -1,0 V na velocidade de 200 mV s^{-1} . Observa-se que a redução da progesterona ocorre no potencial de -1,65 V e a aparição de um leve pico de oxidação ocorre em -1,47 V em tampão B-R (voltamograma **a**). Um pico de redução pouco definido e com baixa densidade de corrente em -1,65 V foi observado para a progesterona em NaOH (voltamograma **b**) e solução Ringer (voltamograma **c**). Em solução de LiOH (voltamograma **d**), um pico mal definido de redução do hormônio surgiu em um potencial mais negativo, -1,71 V.

Como demonstrou um pico bem definido aliado a uma alta densidade de corrente, o tampão B-R (pH 12,0) foi escolhido como o eletrólito suporte para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica.

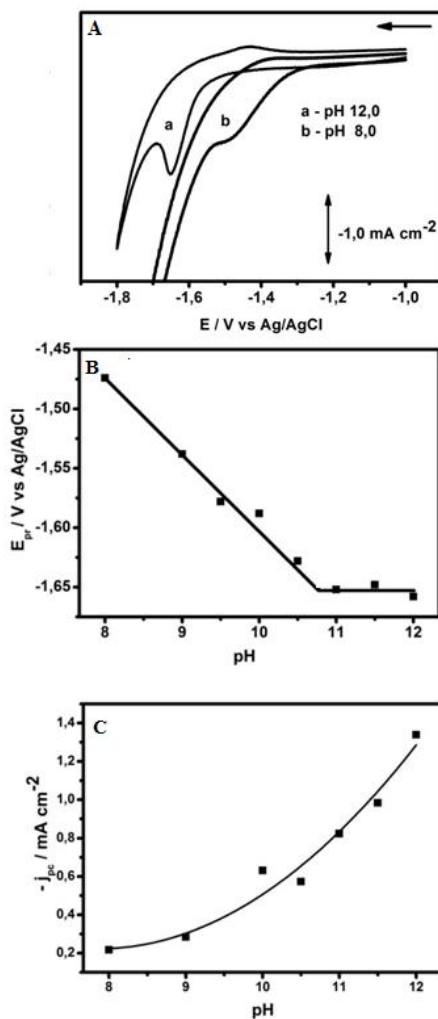


Figura 15. Estudo do pH : (A) voltamogramas cíclicos, (B) potencial e (C) densidade de corrente em função do pH para o EFBi na presença de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) por voltametria cíclica, $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

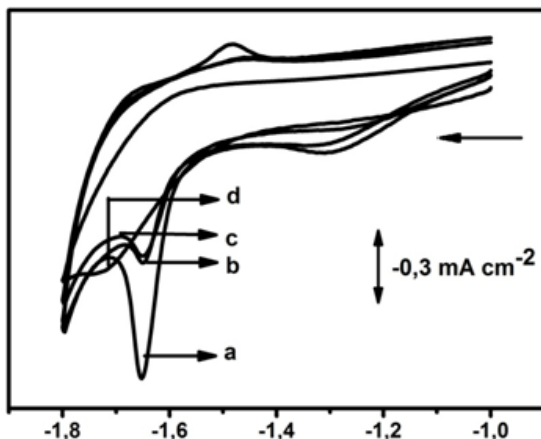


Figura 16. Voltamogramas cíclicos para progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em EFBi imerso em soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de (a) B-R (pH 12,0), (b) NaOH (pH 12,0), (c) Ringer (pH 12,0), (d) LiOH (pH 12,0), $\nu = 200 \text{ mV s}^{-1}$. Pré-concentração: $E_{\text{pc}} = -1,0 \text{ V}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$.

5.1.2.4 Influência da velocidade de varredura

Depois de selecionar os parâmetros de pré-concentração, pH de trabalho e eletrólito suporte, alguns estudos sobre o mecanismo do processo eletrodico foram realizados em função da velocidade de varredura.

Os voltamogramas cíclicos da Figura 17 mostram o comportamento eletroquímico referente à redução da progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) sobre o EFBi. Os voltamogramas foram obtidos aplicando-se, inicialmente, uma varredura de potencial no sentido negativo de $-1,0 \text{ V}$ até $-1,8 \text{ V}$, seguida de uma varredura no sentido positivo até $-1,0 \text{ V}$, em diferentes velocidades de varredura ($50\text{-}300 \text{ mV s}^{-1}$). Durante a aplicação de potencial no sentido negativo ($-1,0 \text{ V}$ até $-1,8 \text{ V}$) o pico referente à redução da progesterona é evidenciado e aumenta à medida que a velocidade de varredura cresce. Durante a varredura no sentido positivo ($-1,8 \text{ V}$ até $-1,0 \text{ V}$) observa-se o surgimento de um pico de oxidação somente em valores de ν maiores que 50 mV s^{-1} , entretanto, diferentemente do pico de redução, esse pico não sofre aumento significativo com a velocidade de varredura. Comportamento semelhante a esse foi observado por Wang *et al.* ⁽⁴⁹⁾ para redução da progesterona em eletrodo gotejante de mercúrio e por

Fernández *et al.* ⁽⁵²⁾ para a redução da progesterona em carbono vítreo, porém os autores não realizaram estudos suficientes para uma explicação concreta desse fato.

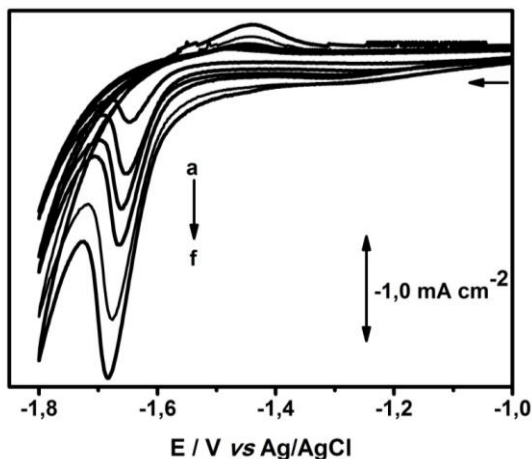


Figura 17. Voltamogramas cíclicos para progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em EFBi imerso em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), ν (a) 50 mV s^{-1} , (b) 100 mV s^{-1} , (c) 150 mV s^{-1} , (d) 200 mV s^{-1} , (e) 250 mV s^{-1} e (f) 300 mV s^{-1} . Pré-concentração: $E_{\text{pc}} = -1,0 \text{ V}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$.

Na Figura 18 pode-se notar um deslocamento do potencial de pico de redução (E_{pr}) para valores mais negativos com o aumento de ν . Esse comportamento concorda com o teórico para uma transferência eletrônica irreversível, ou uma transferência eletrônica com uma reação química acoplada. ⁽⁶²⁾

A Figura 19 mostra que os valores de j_{pc} não apresentam um aumento linear com $\nu^{1/2}$. Isso está de acordo com o comportamento para sistemas irreversíveis ou reversíveis que apresentam complicações cinéticas ou presença de reações químicas anteriores ou posteriores à transferência eletrônica. Além disso, esse comportamento evidencia que o transporte de massa não é a etapa determinante que controla a velocidade da reação. ⁽⁶²⁾

A presença de reações químicas acopladas à transferência eletrônica também foi evidenciada pelo comportamento da função corrente ($j_p \nu^{-1/2}$). A função corrente é um parâmetro independente da velocidade para processos reversíveis e irreversíveis. Entretanto, se o processo é irreversível em virtude das reações químicas acopladas, a

função corrente varia com a velocidade, podendo diminuir ou aumentar com o aumento de ν ⁽⁶²⁾. A Figura 20 mostra um aumento da função corrente com o aumento da velocidade de 50 para 300 mV s^{-1} para a redução da progesterona. Pode-se, então, concluir que ocorre uma reação química acoplada à transferência eletrônica de redução da progesterona na superfície do EFBi.

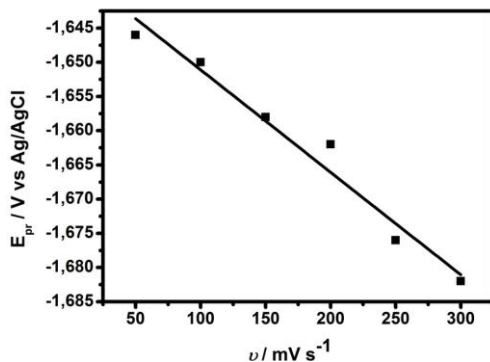


Figura 18. Variação do E_{pr} da progesterona com a ν para uma solução de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

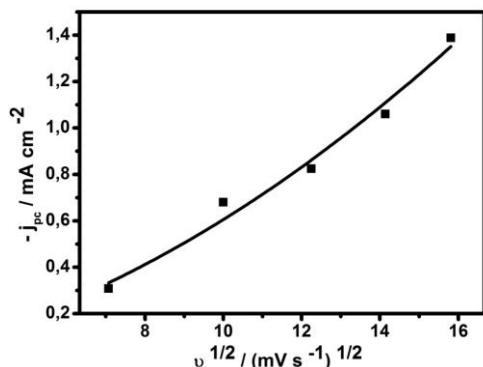


Figura 19. Variação da j_{pc} com a raiz quadrada da ν para uma solução de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

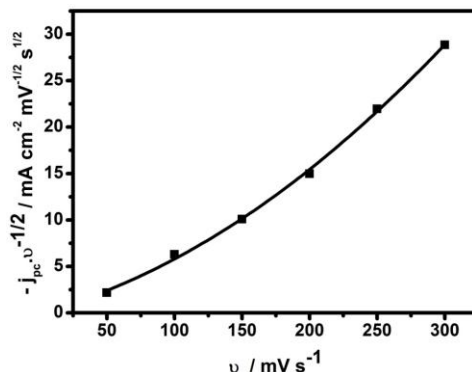


Figura 20. Variação da função corrente do pico de redução da progesterona com a v para uma solução de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

Para demonstrar se a etapa determinante que controla a velocidade da reação é adsorção ou difusão, analisou-se como ocorre a variação do logaritmo da densidade de corrente em função do logaritmo da velocidade. De acordo com a literatura, se um gráfico do $\log j_{pc}$ em função de $\log v$ possui um valor de inclinação próximo de 1, significa que a velocidade da reação é controlada por adsorção. Valores menores que 1 indicam que a velocidade da reação é controlada por difusão. A Figura 21 mostra a variação do $\log j_{pc}$ em função do $\log v$ para uma solução de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). A variação apresentou-se linear e o valor de inclinação obtido foi de 0,9, indicando que a etapa determinante que controla a velocidade da reação é a adsorção.

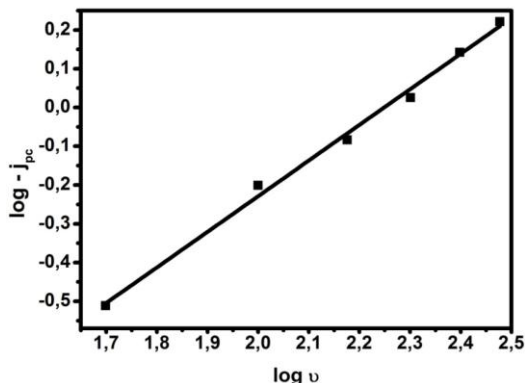


Figura 21. Variação do $\log - j_{pc}$ com o $\log v$ para uma solução de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

Como foi observado anteriormente, E_{pr} deslocou para valores mais negativos com o aumento da velocidade de varredura, como esperado para um processo irreversível. A relação do E_p com $\log v$ para processos irreversíveis é expressa pela Equação 5:

$$E_p = \left(\frac{2,3RT}{\alpha nF} \right) \cdot \log \left(\frac{RTK_f}{\alpha nF} \right) - \left(\frac{2,3RT}{\alpha nF} \right) \log v$$

Na qual, R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T , a temperatura em (K), α , o coeficiente de transferência eletrônica, F , a constante de Faraday (96485 C), K_f , a constante de velocidade da reação eletródica e n , o número de mol de elétrons transferidos na reação eletródica.

A Figura 22 exibe uma dependência linear entre E_{pr} e $\log v$. Com base no valor do coeficiente angular, o número de mol de elétrons participantes da redução da progesterona foi estimado, empregando a Equação 5, considerando-se $\alpha = 0,5$. O valor encontrado para a inclinação do gráfico de E_{pr} vs $\log v$ foi de 0,101 e o valor obtido para n foi de 1,17.

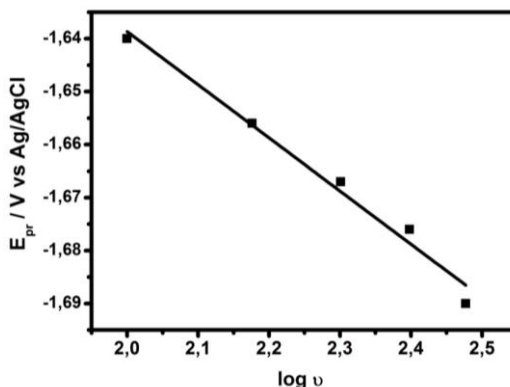


Figura 22. Variação do E_{pr} com o $\log v$ para uma solução de progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

5.1.2.5 Conclusões parciais

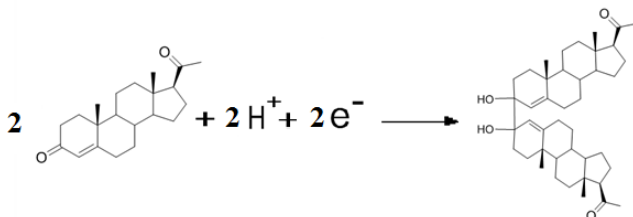
Com base nas considerações feitas na seção 5.1.2, algumas informações sobre o comportamento eletroquímico da progesterona em EFBi foram obtidos.

As análises das varreduras sucessivas indicaram a adsorção da progesterona na superfície do eletrodo, tornando-se necessária uma etapa de pré-concentração antes de cada experimento, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método, fator muito importante para fins quantitativos. Esse comportamento adsorptivo da progesterona também foi constatado por Wang *et al.* ⁽⁴⁹⁾, entre outros pesquisadores ^{(51), (52)}.

Os testes envolvendo pH e eletrólito suporte, demonstraram uma melhor resposta para a progesterona em pH altamente alcalino e, dentre os eletrólitos utilizados, o tampão B-R foi o que apresentou o maior valor de densidade de corrente aliado a um pico de redução bem definido. Por esse motivo, foi escolhido como eletrólito suporte para dar continuidade aos experimentos. A resposta desse hormônio em meio alcalino também concorda com outros trabalhos encontrados na literatura. ^{(49), (51)}

A influência da velocidade de varredura forneceu dados importantes sobre a redução da progesterona. Foi evidenciada uma transferência eletrônica irreversível de 1 mol de elétrons com presença de reação química acoplada como previsto por Fernández e colaboradores ⁽⁵²⁾. Pouco é encontrado na literatura no que diz respeito

ao mecanismo detalhado de redução da progesterona e outros esteróides. Geralmente, é aceito que o mecanismo de eletrorredução de compostos com estrutura semelhante à progesterona esteja associado à redução da carbonila em C-3 conjugada com a dupla ligação em C-4 (anel A, Figura 1) ⁽⁴⁸⁾. No entanto, levando-se em conta que a eletrorredução de compostos com estrutura semelhante à progesterona leva a formação de dímeros ^{(48), (50), (52)}, pode-se sugerir que a reação global da redução da progesterona, proveniente de etapas de reações radiculares ⁽⁵²⁾, seja:



Nesse trabalho, tendo em vista a ausência de algumas informações, como por exemplo, a caracterização da espécie formada após a redução da progesterona, a sugestão de um mecanismo detalhado para a redução desse hormônio fica comprometida. Entretanto, tem-se como perspectiva, a elucidação desse mecanismo.

5.2 Desenvolvimento e aplicação da metodologia

5.2.1 Desenvolvimento do método eletroanalítico

Nas seções seguintes serão mostrados os estudos realizados para o desenvolvimento do método eletroanalítico para a determinação de progesterona empregando o EFBi, depositado na forma *ex situ* com os parâmetros já otimizados (seção 5.1.1). Vale ressaltar que os parâmetros de pré-concentração (seção 5.1.2.2), pH do eletrólito e eletrólito suporte (seção 5.1.2.3) também já foram otimizados e serão utilizados para o desenvolvimento da metodologia.

5.2.1.1 Escolha da técnica

A escolha da técnica voltamétrica é uma etapa essencial na busca da sensibilidade analítica do eletrodo ao analito. As técnicas de pulso são as mais sensíveis entre as técnicas voltamétricas, pois

minimizam a contribuição da corrente capacitiva na leitura da corrente correspondente à reação eletroquímica do composto em estudo.

O sinal de redução da progesterona em EFBi foi investigado qualitativamente por três técnicas de pulso. A Figura 23 mostra os voltamogramas obtidos para a progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ pelas técnicas de (a) pulso diferencial (b) pulso normal e (c) onda quadrada. Como resultado, nota-se um perfil voltamétrico bem definido e um ótimo valor na densidade de corrente para voltametria de onda quadrada (c). Por esse motivo, essa foi a técnica escolhida para dar continuidade aos experimentos.

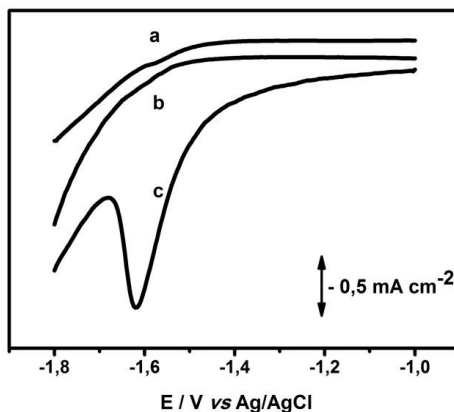


Figura 23. Voltamogramas de (a) pulso diferencial, (b) pulso normal e (c) onda quadrada para a progesterona $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em EFBi em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

5.2.1.2 Otimização dos parâmetros da SWV

A otimização dos parâmetros para a técnica escolhida é de fundamental importância para se obter uma melhor resposta para a intensidade da densidade de corrente, melhorando assim a sensibilidade do método.

Os parâmetros instrumentais investigados foram a frequência de aplicação dos pulsos (f), incremento de potencial (ΔE_s) e amplitude de aplicação dos pulsos de potencial (a). Para a escolha da melhor condição de trabalho, levou-se em consideração uma boa intensidade de densidade de corrente em conjunto com um bom perfil voltamétrico.

Dois importantes parâmetros a serem levados em consideração na voltametria de onda quadrada são a frequência de aplicação dos

pulsos de potencial e o incremento de varredura de potencial, pois a velocidade de varredura dessa técnica é obtida pelo produto desses parâmetros.⁽⁶⁴⁾

A otimização dos parâmetros de voltametria de onda quadrada foi feita em uma solução de progesterona $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) como eletrólito suporte, como mostra a Figura 24. As faixas estudadas foram de 20 - 90 Hz para a frequência, 10 - 100 mV para a amplitude de pulso e 1 - 5 mV para o incremento de potencial. Na Figura 24A, observa-se um aumento nos valores de densidade de corrente catódica com o aumento da frequência. Uma boa concordância entre o perfil voltamétrico e a sensibilidade foi obtida na frequência de 70 Hz. Logo, esse foi o valor escolhido para a realização dos experimentos posteriores. Na Figura 24B, nota-se que os valores de densidade de corrente aumentaram com a amplitude de pulso até aproximadamente 70 mV, e depois uma tendência constante foi adquirida. A amplitude de pulso selecionada para o trabalho foi 50 mV. Na Figura 24C, constata-se um aumento linear dos valores de densidade de corrente com o incremento de varredura, sendo selecionado aqui o valor de 2 mV. A Tabela 3 exhibe os dados referentes à otimização dos parâmetros da SWV.

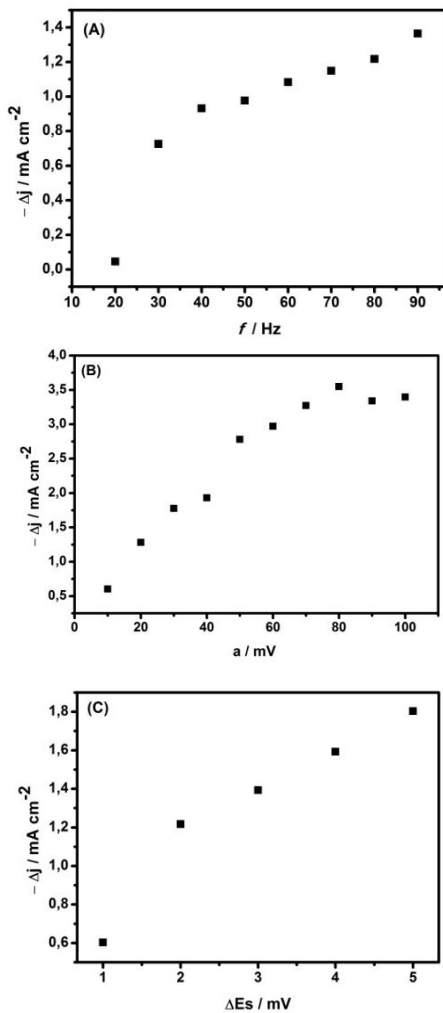


Figura 24. Dependência da corrente catódica com (A) frequência ($a = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$), (B) amplitude de pulso ($f = 70 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$) e (C) incremento de potencial ($f = 70 \text{ Hz}$ e $a = 50 \text{ mV}$) para um EFBi imerso em tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) contendo progesterona $6,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Dados obtidos por voltametria de onda quadrada.

Tabela 3- Otimização dos parâmetros experimentais por SWV para análise de progesterona

Parâmetro	Faixa	Valor estabelecido
frequência	20- 90 Hz	70 Hz
amplitude de pulso	10- 100 mV	50 mV
incremento de potencial	1-5 mV	2 mV

5.2.1.3 Curva de calibração

Com os valores dos parâmetros ótimos estabelecidos para o método proposto (Tabela 3), a curva de calibração foi construída com a adição de alíquotas de solução padrão de progesterona ao eletrólito suporte, variando a concentração na célula eletroquímica.

A curva de calibração para a progesterona foi obtida em tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0) usando o EFBi (Figura 25). Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos e a resultante da densidade de corrente catódica foi registrada juntamente com o potencial de pico. A Figura 25A mostra os voltamogramas de onda quadrada para a progesterona após sucessivas adições da solução padrão, e a Figura 25B mostra a curva de calibração. Observam-se um pico de redução bem definido em torno de -1,63 V e os valores de densidade de corrente aumentando proporcionalmente com a concentração do hormônio.

Uma medida bastante usada para verificar a linearidade da curva de calibração é a análise do valor do quadrado do coeficiente de correlação (R²). R² deve estar o mais próximo de 1 para representar um verdadeiro ajuste linear ⁽⁶⁶⁾. A curva de calibração obtida apresentou uma resposta linear na faixa de 0,40 - 7,90 µmol L⁻¹ com uma equação da reta expressa por: $\Delta j / \text{mA cm}^{-2} = 0,5691 [\text{progesterona}] / \mu\text{mol L}^{-1} - 0,0049$ e R² igual a 0,9983.

O limite de detecção e o limite de quantificação representam a mais baixa concentração em que a substância possa ser detectada com certa confiabilidade, e a mais baixa concentração que poderá ser quantificada, respectivamente. Esses parâmetros podem ser obtidos com dados da curva de calibração e calculados pelas equações e 6 e 7.

$$LD = 3 \frac{DP}{a} \quad (5) \quad LQ = 10 \frac{DP}{a} \quad (6)$$

Na qual DP é o desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta, 3 um fator de multiplicação para um nível de confiança de 95% ⁽⁶⁷⁾ e a é a

inclinação da curva de calibração. Os valores encontrados para LD e LQ foram $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,61 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

A precisão de um procedimento analítico indica quanto duas ou mais medidas estão em concordância quando repetidas sob condições definidas, e é expressa em termos de desvio padrão (DP), desvio padrão relativo (DPR) ou através do intervalo de confiança ⁽⁶⁷⁾. A precisão das medidas foi analisada por meio da repetibilidade das densidades de correntes catódicas obtidas por voltametria de onda quadrada, nas condições experimentais já estabelecidas. Utilizaram-se duas metodologias: interdica, na qual cinco determinações de progesterona $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram realizadas em cinco dias diferentes, sendo que em cada dia era preparada uma nova solução, e intradia, realizando-se 5 medidas de determinação empregando a mesma solução de progesterona $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em um mesmo dia. O desvio padrão relativo compreendeu valores entre 2,7% e 2,9%. Resultados para a repetibilidade do potencial de pico de redução também foram encontrados. Todos os dados relatados acima, extraídos da curva de calibração, encontram-se na Tabela 4.

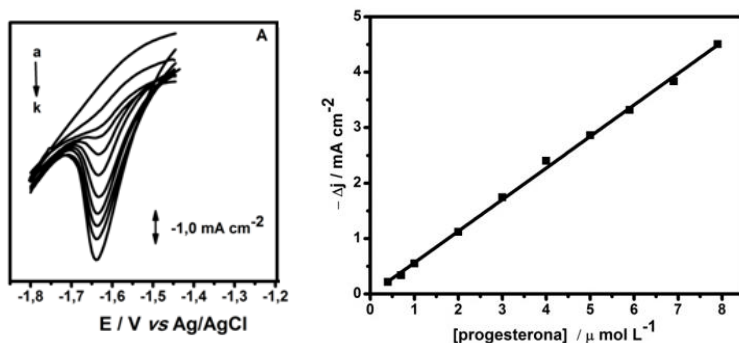


Figura 25- A) Voltamogramas de onda quadrada para a progesterona em solução de tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0) em EFBi: (a) branco, (b) $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $5,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, (j) $6,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, (k) $7,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Dependência da j_{pc} em função da concentração da progesterona (curva de calibração). Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0 \text{ V}$, $t_{pc} = 60 \text{ s}$.

Tabela 4- Parâmetros obtidos da curva de calibração para a determinação de progesterona

Parâmetro	Valor
Potencial de pico (V)	- 1,63
Linearidade ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,40 a 7,90
R^2	0,9983
Coeficiente angular ($\text{mA L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	0,5691
DP de coeficiente angular ($\text{mA L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)	$7,77 \times 10^{-3}$
Coeficiente linear (mA cm^{-2})	- 0,0049
DP do coeficiente linear (mA cm^{-2})	0,0348
Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,18
Limite de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,61
Repetibilidade da j_{pc} (intradia) (%) ^{a, b}	2,92
Repetibilidade da j_{pc} (interdia) (%) ^{a, b}	2,69
Repetibilidade do E_{pr} (intradia) (%) ^{a, b}	0,17
Repetibilidade do E_{pr} (intradia) (%) ^{a, b}	0,34

^a Desvio padrão relativo (%) ^b n = 5.

5.2.1.4 Estudo dos interferentes

A presença de excipientes em fármacos pode ocasionar erros na leitura da corrente do analito de interesse, prejudicando assim a determinação eletroanalítica. Portanto, os estudos para os possíveis interferentes foram realizados nas amostras empregadas para a determinação de progesterona.

Na amostra A (gel de progesterona), além de progesterona, são encontrados parabenos, fenoxietanol, hidroxietilcelulose, excipientes que, juntos, formam o gel. Na amostra B (creme de progesterona) encontram-se como excipientes os seguintes compostos: álcool cetosteárfico, óleo mineral, álcool de lanolina, parabenos, fenoxietanol, propilenoglicol e água, formando um creme. Já para a amostra C (loção capilar), além do hormônio, a loção capilar é uma mistura de 70% de etanol e 30% de água. Para a realização do estudo dos interferentes, essas amostras foram conseguidas na ausência de progesterona, ou seja, a farmácia de manipulação que cedeu os medicamentos para a realização das determinações também forneceu somente as matrizes dos medicamentos (sem o hormônio) para efetuar

os testes de interferência. Por exemplo, o gel de progesterona, como relatado acima, é uma mistura de vários componentes além do princípio ativo (hormônio). Para a realização desse teste, somente a matriz (a mistura como um todo sem a progesterona) foi utilizada para o estudo dos interferentes, não sendo necessária a obtenção de cada componente separadamente.

A amostra D (Utrogestan®), apresenta como excipientes lecitina de soja e óleo de amendoim. Pelo fato de o fármaco ser composto apenas de dois excipientes, foi mais fácil conseguir cada excipiente. Nesse caso, analisou-se separadamente a lecitina de soja e também o óleo de amendoim.

Portanto, os possíveis interferentes foram testados na presença de uma solução de progesterona $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ por voltametria de onda quadrada ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$), em tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ B-R (pH 12,0).

As razões de progesterona: interferentes estudadas foram 1: 0; 1: 0,01; 1: 0,1; 1: 1 e 1: 10. Os resultados para a determinação da densidade de corrente catódica (Δj_{pc}) obtidos dos voltamogramas de redução de progesterona na ausência e na presença dos possíveis interferentes são mostrados na Tabela 5. Conforme pode ser visto, na maioria dos resultados, a densidade de corrente referente à redução da progesterona permaneceu constante mesmo na presença dos interferentes, exceto para a lecitina de soja na razão 1:10 (progesterona: interferente), a qual apresentou um pico de redução em aproximadamente $-1,39 \text{ V}$, diminuindo a intensidade do pico de redução da progesterona. Isso significa que a determinação de progesterona por esse método desenvolvido, nesse caso, ficará impossibilitada quando a proporção de lecitina de soja for 10 vezes maior que a do hormônio.

Tabela 5- Estudo dos possíveis interferentes para a determinação da progesterona em fármacos

		Razão Progesterona: Interferentes				
		(1: 0)	(1: 0,01)	(1: 0,1)	(1: 1)	(1: 10)
Amostras	Excipientes	Δj_{pc} (mA cm ⁻²) ^a				
A	parabenos, fenoxietanol	3,35	3,36	3,33	3,32	3,37
	hidroxietilcelulose					
B	Álcool cetosteárflico	3,31	3,33	3,35	3,34	3,32
	óleo mineral					
	álcool de lanolina					
	parabenos					
	fenoxietanol propilenoglicol					
C	etanol	3,33	3,33	3,35	3,34	3,36
D	lecitina de soja	3,34	3,34	3,36	3,34	2,10
	óleo de amendoim	3,32	3,33	3,33	3,33	3,32

^a n= 3

5.2.2 Aplicação da metodologia para a determinação de progesterona em fármacos

5.2.2.1 Determinação de progesterona em fármacos por SWV

Experimentos de determinação do hormônio foram obtidos pela adição da solução padrão nas amostras dos fármacos A, B, C e D. As soluções de amostras preparadas foram diluídas diretamente na célula eletroquímica contendo 25 mL de tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0) como descrito no procedimento experimental (seção 4.3.1.3).

As Figuras 26, 27, 28 e 29 referem-se às determinações de progesterona nas amostras farmacêuticas A, B, C e D, respectivamente. Nas figuras nomeadas com a letra A, são exibidos os voltamogramas de onda quadrada para a amostra e para as adições sucessivas do padrão e nas figuras intitulados com B são mostradas as curvas de adição de padrão juntamente com a curva de calibração. Os voltamogramas apresentaram pico de redução bem definido e os valores de densidades de corrente foram proporcionais à concentração para as curvas de adição de padrão. As inclinações das curvas de adição de padrão foram 0,639 mA L μmol^{-1} cm⁻²; 0,534 mA L μmol^{-1} cm⁻²; 0,499 mA L μmol^{-1} cm⁻² e

$0,634 \text{ mA L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ($R^2_{\text{A}} = 0,9921$; $R^2_{\text{B}} = 0,9961$; $R^2_{\text{C}} = 0,9900$; $R^2_{\text{D}} = 0,9855$) para as amostras A, B, C, D, respectivamente, bem próximas do valor da inclinação obtida pela curva de calibração ($0,5691$), indicando assim uma excelente seletividade do método proposto.

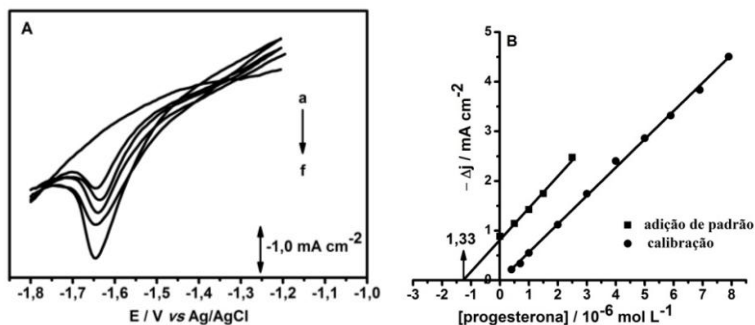


Figura 26. A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), (b) adição de $75 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra de gel de progesterona; (c-e) adição de $25 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona; (f) adição de $50 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Curva de adição de padrão para amostra de gel de progesterona e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{\text{pc}} = -1,0 \text{ V}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$.

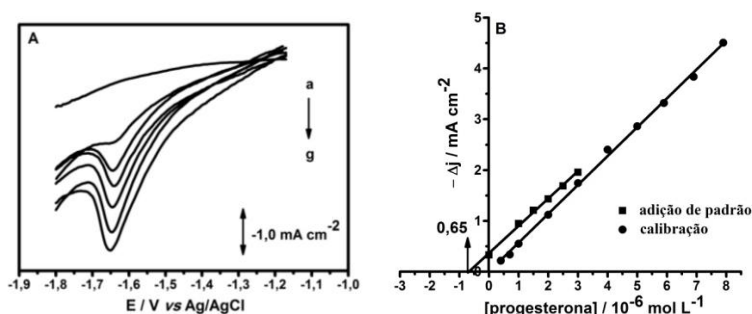


Figura 27. A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 12,0), (b) adição de $100 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra de creme de progesterona; (c) adição de $75 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona; (d-g) adição de $25 \text{ } \mu\text{L}$ do padrão de progesterona ($f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$). B) Curva de adição de padrão para amostra de creme de progesterona e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{\text{pc}} = -1,0 \text{ V}$, $t_{\text{pc}} = 60 \text{ s}$.

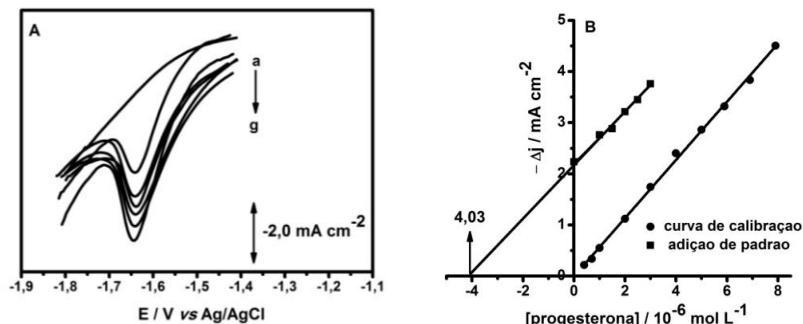


Figura 28. A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0), (b) adição de 125 μL da amostra de solução capilar de progesterona; (c) adição de 50 μL do padrão de progesterona; (d-g) adição de 25 μL do padrão de progesterona ($f = 70$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV). B) Curva de adição de padrão para amostra de solução capilar de progesterona e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.

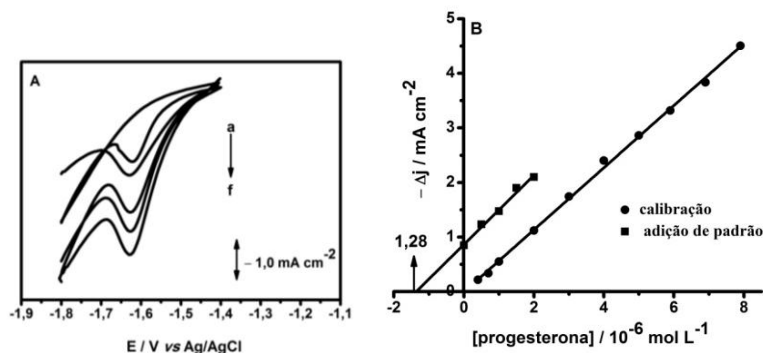


Figura 29. A) Voltamogramas de onda quadrada para (a) tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 12,0), (b) adição de 100 μL da amostra de Utrogestan®; (c-f) adição de 25 μL do padrão de progesterona ($f = 70$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV). B) Curva de adição de padrão para amostra de Utrogestan® e curva de calibração. Pré-concentração: $E_{pc} = -1,0$ V, $t_{pc} = 60$ s.

As tabelas 6, 7, 8 e 9 mostram os resultados alcançados para a quantificação de progesterona nas amostras farmacêuticas, realizadas em triplicata no mesmo dia (intradia) e em dias diferentes (interdia).

Tabela 6- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra A pelo método proposto

Amostra A	Valor encontrado (mg)	Média (mg)	DPR(%)
Gel de progesterona (intradia)	444	447	1,23
	453		
	443		
Gel de progesterona (interdia)	444	440	4,04
	456		
	421		

Tabela 7- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra B pelo método proposto

Amostra B	Valor encontrado (mg)	Média (mg)	DPR(%)
Creme de progesterona (intradia)	743	752	1,20
	752		
	761		
Creme de progesterona (interdia)	756	755	1,53
	743		
	766		

Tabela 8- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra C pelo método proposto

Amostra C	Valor encontrado (mg)	Média (mg)	DPR(%)
Solução capilar (intradia)	1010	1033	2,44
	1030		
	1060		
Solução capilar (interdia)	1010	1043	2,93
	1070		
	1050		

Tabela 9- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona na amostra D pelo método proposto

Amostra D	Valor encontrado (mg)	Média (mg)	DPR (%)
Utrogestan ® (intradia)	101	101	1,51
	103		
	100		
Utrogestan ® (interdia)	101	101	1,98
	103		
	099		

5.2.2.2 Ensaios de recuperação

Com a finalidade de verificar a exatidão das determinações, ensaios de recuperação foram realizados. Quatro adições do padrão de progesterona foram adicionadas à amostra A e D e obteve-se uma recuperação na faixa 104-115% para A, e 90-110% para D. Para as amostras B e C, foram feitas cinco adições sucessivas de padrão e as recuperações obtidas ficaram na faixa 94-101% para B e 97-115% para C. Os dados de recuperação estão exibidos nas Tabelas 10, 11, 12 e 13 para as amostras A, B, C e D, respectivamente. Esses dados revelam uma exatidão da metodologia desenvolvida.

Tabela 10- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra A

Amostra A	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Gel de progesterona	0,50	0,53	107
	1,00	1,12	112
	1,50	1,56	104
	2,00	2,13	115

Tabela 11- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra B

Amostra B	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Creme de progesterona	1,00	0,94	94
	1,50	1,44	96
	2,00	2,00	100
	2,50	2,54	101
	3,00	3,03	101

Tabela 12- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra C

Amostra C	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
	1,00	0,97	97
Loção	1,50	1,73	115
capilar de	2,00	2,01	100
progesterona	2,50	2,55	102
	3,00	2,93	98

Tabela 13- Estudo da recuperação pelo método da adição de padrão na amostra D

Amostra D	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
	0,50	0,45	90
Utrogestan	1,00	1,06	106
®	1,50	1,65	110
	2,00	2,10	105

5.2.2.3 Determinação de progesterona nas amostras através do método comparativo e tratamento estatístico dos dados

Outra forma de verificar a exatidão do método desenvolvido é a comparação dos resultados obtidos com os resultados de um segundo método conhecido. Assim, para testar a viabilidade de utilização da metodologia eletroanalítica, empregou-se como método comparativo a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta.

Os espectros de absorção de UV para uma solução de progesterona $47,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol e para o etanol puro (branco) são exibidos na Figura 30. Conforme pode ser visto, a progesterona apresentou um máximo de absorbância em 240 nm, sendo que nenhuma outra característica de absorção da amostra foi observada quando o intervalo foi ampliado até o comprimento de onda 800 nm.

A Figura 31 apresenta os espectros de UV com a respectiva curva de calibração para o padrão de progesterona na faixa de concentração de $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $57,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. A curva de calibração apresentou linearidade em toda faixa de concentração estudada, com $R^2 = 0,9998$.

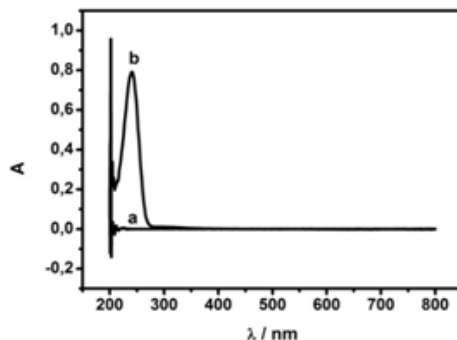


Figura 30. Espectro de absorção no ultravioleta para: a) etanol e (b) uma solução de progesterona $47,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol.

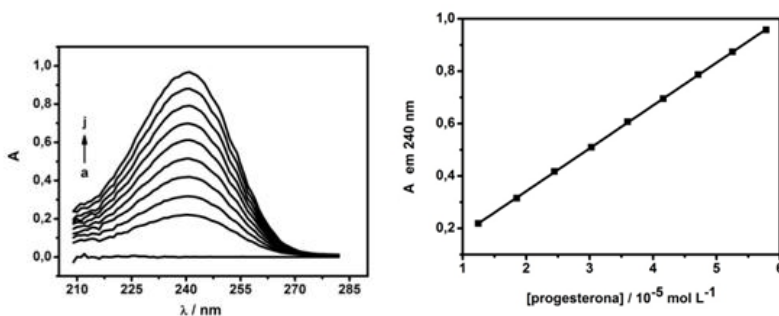


Figura 31. Espectros de absorção no ultravioleta (a) branco, (b) $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $18,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $24,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $30,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $36,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $41,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, (h) $47,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (i) $52,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (j) $57,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e curva de calibração da absorbância (240 nm) em função da concentração da progesterona para os dados já mencionados.

Após a obtenção da curva de calibração para o padrão de progesterona, o método foi aplicado para a determinação de progesterona nos fármacos. Os resultados para a determinação em triplicata para as amostras A, B, C e D pelo método comparativo estão apresentados na Tabela 14 e mostraram um DPR menor que 2% para todas as amostras, indicando uma boa precisão para o método, tornando possível, deste modo, a sua utilização para comparação dos dados.

Tabela 14- Resultados obtidos para a quantificação de progesterona em amostras diversas usando o método comparativo

Amostra	Valor encontrado (mg)	Média (mg)	DPR (%)
A	447	446	1,03
	441		
	450		
B	759	757	0,75
	762		
	751		
C	1019	1023	1,37
	1012		
	1039		
D	100	102	1,50
	103		
	102		

A Tabela 15 apresenta os dados referentes ao tratamento estatístico obtido pelos resultados das quantificações de progesterona nas amostras de fármacos A, B, C e D pelos dois métodos (eletroanalítico e UV). O tratamento estatístico tem a finalidade de avaliar o método desenvolvido nesse trabalho quanto à exatidão e à precisão dos resultados. Na Tabela 15 são demonstrados os valores obtidos de erro relativo entre o método proposto ou comparativo e os valores rotulados pelo fabricante (E_{r1}) e os valores de erro relativo encontrados entre o método desenvolvido e o método comparativo (E_{r2}). Constata-se que os maiores valores de erro foram obtidos quando as quantificações feitas pelos dois métodos foram comparadas aos valores fornecidos pelo fabricante, chegando a 3%. O erro relativo obtido pela comparação entre os dois métodos mostrou-se menor que 1%. Esses valores são aceitáveis para amostras em microquantidades⁽⁶⁷⁾, indicando assim uma boa exatidão do método proposto.

Para analisar se o procedimento analítico do método desenvolvido foi preciso, exato ou ainda superior a outro método, podem-se comparar os resultados obtidos pelo método proposto com os resultados obtidos de outros conjuntos de dados. Dois testes muito utilizados para a comparação dos resultados são: (a) teste t de Student e (b) teste das razões das variâncias (teste F).⁽⁶⁸⁾

O teste t é empregado para comparar um conjunto de dados com outro, a fim de decidir se são ou não “diferentes” ⁽⁶⁶⁾. Neste caso, aplicou-se o teste t para comparar os resultados obtidos pelos dois métodos e o valor fornecido pelo fabricante (aceito como valor verdadeiro). Verificou-se que o valor de $t_{\text{teórico}}$ para 2 graus de liberdade em um nível de confiança de 95% é de 4,30. Tanto para o método comparativo quanto para o método proposto, os t_{valores} encontrados foram menores que o valor de $t_{\text{teórico}}$ (4,30), indicando assim que não existem diferenças significativas nos valores obtidos pelos dois métodos e o valor “verdadeiro” (fornecido pelo fabricante).

A discrepância entre o método proposto e o método comparativo foi verificada aplicando-se o teste F . Sendo o valor de $F_{\text{teórico}}$ (19) para um nível de 95% de confiança, com dois graus de liberdade, os F_{valores} encontrados para os quatro medicamentos foram muito menores que 19, indicando assim não haver diferença significativa na precisão fornecida pelos dois métodos empregados na determinação de progesterona em fármacos.

Os resultados discutidos acima mostram que a quantificação da progesterona em amostras farmacêuticas através da metodologia eletroanalítica empregando EFBi tem exatidão e precisão comparáveis ao valor rotulado de cada fármaco e aos valores obtidos pelo método comparativo.

Tabela 15- Tratamento estatístico da determinação de progesterona em medicamentos

Amostra	A		B		C		D	
Método	UV	EFBi	UV	EFB i	UV	EFB i	UV	EFBi
Valores rotulados (mg)	450	450	750	750	1000	1000	100	100
Encontrado (mg) ^a	446	447	757	752	1023	1033	102	101
DPR (%)	1,03	1,23	0,75	1,15	1,37	2,44	1,50	1,51
Er _i (%) ^b	-0,89	-0,67	0,93	0,27	2,30	3,30	2,00	1,00
Er ₂ (%) ^c	----	0,22	---	-0,66	---	0,97	---	-0,98
t _{valor} ^d	-1,51	-0,94	2,13	0,38	2,84	2,27	2,13	1,13
F _{valor} ^e	1,45	1,45	2,50	2,50	3,23	3,23	1,00	1,00

^a n = 3

^b Er₁ = Erro relativo entre o método proposto ou comparativo e os valores rotulados.

^c Er₂ = Erro relativo entre o método proposto e o método comparativo.

^d t_{teórico} = 4,30

^e F_{teórico} = 19

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho descreveu o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação do hormônio progesterona em fármacos utilizando o eletrodo de filme de bismuto.

Inicialmente o EFBi foi obtido pelo método *ex situ*, no qual um potencial de deposição de -300 mV por 12 s foi aplicado na superfície do carbono vítreo em solução de HCl 1,0 mol L⁻¹ contendo Bi(III) 2,0 x 10⁻² mol L⁻¹. Evidências sobre o comportamento eletroquímico foram investigadas e a progesterona apresentou um pico bem definido de redução em -1,68 V e um pico mal definido de oxidação em -1,47 V. Entretanto, o processo de transferência eletrônica foi caracterizado como irreversível, com 1 mol de elétron envolvido e presença de reação química acoplada. Possivelmente o processo de redução da progesterona pode estar associado à redução da carbonila do agrupamento α , β -insaturado, levando à formação de um dímero.

Para o desenvolvimento da metodologia, a voltametria de onda quadrada mostrou-se a técnica mais sensível e, por isso, foi escolhida. O método desenvolvido utilizando o EFBi apresentou linearidade na faixa de 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 7,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção e quantificação iguais a 0,18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A exatidão na determinação de progesterona nas amostras de fármacos foi mostrada pelos significativos resultados de recuperação (90-115%) e pela comparação com os resultados obtidos com o método comparativo.

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que o método eletroanalítico proposto para determinação de progesterona empregando o EFBi por voltametria de onda quadrada pode ser utilizado para a determinação em matrizes farmacêuticas, podendo assim ser aplicado no controle de qualidade na indústria de fármacos. O EFBi mostrou excelente eficiência para o desenvolvimento do método, como se pode constatar pelos parâmetros da curva de calibração obtida, pelos ensaios de recuperação e pela comparação dos resultados do método proposto com o método comparativo.

Como perspectivas futuras desse trabalho podem ser realizados estudos com o objetivo de esclarecer o mecanismo de redução da progesterona em meio básico utilizando o EFBi e técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, como também de investigar o potencial do EFBi para determinação de progesterona em amostras biológicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ECONOMOU, A. **Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis.** *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24, 334-340.
2. BOBROWSKI, A.; KRÓLICKA, A. **Bismuth film electrode for adsorptive stripping voltammetry – electrochemical and microscopic study.** *Electrochemistry Communications*, 2004, 6, 99-104.
3. OGOREVC, B. et al. **An introduction to bismuth film electrode for use in cathodic electrochemical detection.** *Electrochemistry Communications*, 2001, 3, 707-711.
4. WANG, J. et al. **Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry.** *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 3218-3222.
5. HOCEVAR, S. B. et al. **A decade with bismuth- based electrodes in electroanalysis.** *Electroanalysis*, 2010, 22, 1405-1420.
6. **Farmacopeia Brasileira**, Brasil: Agência nacional de vigilância sanitária. 2010. Vol.2.
7. BRETT, C. M. A. et al. **Characterization and Application of Bismuth-Film Modified Carbon Film Electrodes.** *Electroanalysis*, 2005, 17, 15-16.
8. COMPTON, R. G. et al. **Manganese detection in marine sediments: anodic vs. cathodic stripping voltammetry.** *Talanta*, 2005, 65, 423-429.
9. WANG, J. et al. **Adsorptive stripping voltammetric measurements of trace uranium at the bismuth film electrode.** *Analytica Chimica Acta*, 2005, 535, 9-13.
10. KADARA, R. O. et al. **Resolving the copper interference effect on the stripping chronopotentiometric response of lead(II) obtained at bismuth film screen-printed electrode.** *Talanta*, 2005, 66, 1089-1093.
11. LEGELAI, S.; BOIS, S.; VITTORI, O. **A copper bismuth film electrode for adsorptive cathodic.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2006, 591, 93-98.
12. SOTIROPOULOS, S. et al. **Effect of Bi(III) concentration on the stripping voltametric response of in situ bismuth-coated carbon paste and gold electrodes.** *Electrochimica Acta*, 2006, 52, 481-490.
13. HUTTON, E. A. et al. **Validation of bismuth film electrode for determination of cobalt and cadmium in soil extracts using ICP-MS.** *Talanta*, 2004, 63, 849-855.
14. HUTTON, E. A.; OGOREVC, B.; HOČEVAR, S. B. **Ex situ preparation of bismuth film microelectrode for use in**

electrochemical stripping microanalysis. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 537, 285-292.

15. HU, X. et al. **Determination of cadmium with a sequential injection lab-on-valve by anodic stripping voltammetry using a nafion coated bismuth film electrode.** *Talanta*, 2010, 80, 1959-1963.

16. WANG, J. et al. **Simultaneous determination of Cd (II) and Pb (II) by differential pulse anodic stripping voltammetry based on graphite nanofibers–Nafion composite modified bismuth film electrode.** *Talanta*, 2010, 83, 332-336.

17. LI, X. et al. **Determination of trace selenium by differential pulse adsorptive stripping voltammetry at a bismuth film electrode.** *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 4717-4721.

18. ARDUINI, F. et al. **Part I: A comparative study of bismuth-modified screen-printed electrodes for lead detection.** *Analytica Chimica Acta*, 2011, 707, 171-177.

19. HU, X. et al. **Simultaneous determination of ultratrace lead and cadmium by square wave stripping voltammetry with in situ depositing bismuth at Nafion-medical stone doped disposable electrode.** *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 191, 26-31.

20. ECONOMOU, A.; KOKKINOS, C. **Disposable Nafion-modified micro-fabricated bismuth-film sensors for voltammetric stripping analysis of trace metals in the presence of surfactants.** *Talanta*, 2011, 84, 696-701.

21. AGGARWAL, S. K. et al. **Scope of detection and determination of gallium (III) in industrial ground water by square wave anodic stripping voltammetry on bismuth film electrode.** *Talanta*, 2011, 86, 256-265.

22. SEGURA, R. et al. **Adsorptive stripping voltammetry of nickel with 1-nitroso-2-naphthol using a bismuth film electrode.** *Talanta*, 2011, 85, 2316-2319.

23. SPINELLI, A. et al. **In situ bismuth-film electrode for square-wave anodic stripping voltammetric determination of tin in biodiesel.** *Electrochimica Acta*, 2011, 56, 4678-4684.

24. OGOREVEC, B.; HUTTON, E. A.; SMYTH, M. R. **Cathodic Electrochemical detection of nitrophenols at a bismuth film electrode for use in flow analysis.** *Electroanalysis*, 2004, 16, 1616-621.

25. TÓTH, K. et al. **Bismuth film electrode for the cathodic electrochemical determination of thiamethoxam.** *Electroanalysis*, 2006, 18, 1363-1371.
26. ARRIBAS, A. S. et al. **Voltammetric detection of the herbicide metamitron at a bismuth film electrode in nondeaerated solution.** *Electroanalysis*, 2006, 18, 2331-2336.
27. DU, D. et al. **Cathodic electrochemical analysis of methyl parathion at bismuth-film-modified glassy carbon electrode.** *Electrochimica Acta*, 2008, 53, 4478-4484.
28. MORENO, M. et al. **Cathodic electrochemical determination of herbicides in acid media using a bismuth film electrode.** *Electroanalysis*, 2009, 21, 415-421.
29. KANATHARANA, P.; SATTAYASAMITSATHIT, S.; THAVARUNGKUL, P.; **Bismuth Film Electrode for Analysis of Tetracycline in Flow Injection System.** *Electroanalysis*, 2007, 19, 502-505.
30. BARRADO, E. et al. **Validation of a tubular bismuth film amperometric detector determination of diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 45, 47-53.
31. SPINELLI, A. et al. **Application of bismuth-film electrode for cathodic electroanalytical determination of sulfadiazine.** *Electrochimica Acta*, 2010, 55, 4970-4975.
32. HOCEVAR, S.B. et al. **Bismuth film electrode for stripping voltammetric measurement of sildenafil Citrate.** *Electrochimica Acta*, 2012, 60, 274-277.
33. NIGOVIĆ, B.; ŠIMUNÍĆ, B.; HOCEVAR, S. **Voltammetric measurements of aminosalicylate drugs using bismuth film electrode.** *Electrochimica Acta*, 2009, 54, 5678-5683.
34. TIMUR, S. et al. **α -Glucosidase based bismuth film electrode for inhibitor detection.** *Anal. Chim. Acta*, 2007, 598, 143-146.
35. ANIK, U. et al. **The usage of a bismuth film electrode as transducer in glucose biosensing.** *Microchim Acta*, 2008, 160, 269-273.
36. ZALÁNYI, S. **Progesterone and ovulation.** *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2001, 98, 152-159.
37. VIGO, F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, H. V. E. **Progestógenos: farmacología e uso clínico.** *Femina*, 2011, 39, 126-137.

38. HANDKE, A.; WEHNER, R. **Simple and rapid method for the determination of progesterone in rat plasma by gas-liquid chromatography with electron-capture detection.** *Journal of Chromatography*, 1979, 177, 237-244.
39. RAGGI, M. A. et al. **Determination of progesterone in commercial formulations and in non conventional micellar systems.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2003, 30, 1549-1559.
40. NOGUEIRA, J. M. F.; ALMEIDA, C. **Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41, 1303-1311.
41. JIANG, G. B. et al. **Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction.** *Talanta*, 2006, 70, 47-51.
42. KAWAGUCHI, M. **Development of vial wall sorptive extraction and its application to determination of progesterone in human serum.** *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, 7553-7557.
43. SHARMA, V. K. et al. **Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Chemosphere*, 2010, 78, 972-979.
44. OSAWA, T. et al. **Validation of a direct time-resolved fluoroimmunoassay for progesterone in milk from dairy and beef cows.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 4753- 4759.
45. MEDEL, A. S. et al. **Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine Milk.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 4753 - 4759.
46. XU, W. et al. **Micro-plate chemiluminescence enzyme immunoassay for clinical determination of progesterone in human serum.** *Chin J Anal Chem*, 2008, 36, 729-734.
47. WOODSON, A. L.; SMITH, D. E. **Direct current and alternating current polarographic response of some pharmaceuticals in an aprotic organic solvent system.** *Analytical Chemistry*, 1970, 42, 242-248.
48. OORT, W. J. V. et al. **Polarographic analysis for corticosteroids: Part 1. The electroanalytical properties of corticosteroids.** *Analytica Chimica Acta*, 1978, 102, 141-155.

49. WANG, J.; FARIAS, P. A. M.; MAHMOUD, J. S. **Adsorptive stripping voltammetry of sex hormones at the static mercury drop electrode.** *Analytica Chimica Acta*, 1985, 171, 195-204.
50. GUIDELLI, R.; MONCELLI, M. R.; VICENTE M. S. **Chronocoulometric study of electrode kinetics in the case of an adsorbed redox couple: Progesterone electroreduction on mercury from aqueous solutions.** *J. Electroanal. Chem*, 1988, 248, 55-67.
51. HU, S.; YAN, Y.; ZHAO, Z. **Determination of progesterone based on the enhancement effect of surfactants in linear sweep polarography.** *Analytica Chimica Acta*, 1991, 248, 103-108.
52. FERNÁNDEZ, H. et al. **Novel studies about the electrochemical reduction of progesterone (P4) in acetonitrile at glassy carbon electrodes.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2008, 619-620, 46-52.
53. FERNÁNDEZ, H. et al. **Studies about the adsorption of progesterone (P4) at glassy carbon electrodes in aqueous buffer solution by square wave voltammetry.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2009, 629, 133-137.
54. XU, Y. F.; VELASCO-GARCIA, M.; MOTTRAM, T. T. **Quantitative analysis of the response of an electrochemical biosensor for progesterone in milk.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20, 2061-2070.
55. KANE, M. et al. **Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk.** *Journal of Immunological Methods*, 2002, 267, 131-138.
56. HART, J. P. et al. **Studies towards a disposable screenprinted amperometric biosensor for progesterone.** *Biosensors & Bioelectronics*, 1977, 12, 1113-1121.
57. KAPPEL, N. D.; PROLL, F.; GAUGLITZ, G. **Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22, 2295-2300.
58. DELWICHE, M. J; CLAYCOMB, R. W. **Biosensor for on-line measurement of bovine progesterone during milking.** *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, 13, 1173-1180.
59. FORSTER, E. E.; SCHELLER, F. W.; BIER, F. F. **Detection of progesterone in whole blood samples.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 18, 375-380.

60. SKOOG, D. A. et al. Tradução de M. T Grassi. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006.
61. ALEIXO, L. M. **Voltametria**: Conceitos e Técnicas. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>>. Acesso em: 28 jan. 2012.
62. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods, fundamentals and applications**. New York: John Wiley & Sons Inc, 1980.
63. BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electroanalysis**. Oxford Chemistry primer. Vol. 64. Oxford Science Publications, 1998, 1st edition Oxford.
64. SOUSA, D.; MACHADO, S. A.; AVACA, L. A. **Voltametria de onda quadrada**. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química Nova*, 2003, 26, 81-89.
65. AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V. **O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo**. *Química nova*, 2004, 27, 813-817.
66. HARRIS, D. C. Tradução de J. Bordinhão et al. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.
67. RIBANI, M. et al. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. *Química Nova*, 2004, 27, 771-780.
68. JEFFERY, G.H; et al. Tradução de Horacio Macedo. **Vogel: Análise química quantitativa**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1992.